

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

Departamento de Biología Molecular

**ACOPLAMIENTO FUNCIONAL ENTRE EL VIRUS DE LA GRIPE  
Y LA MAQUINARIA DE TRANSCRIPCIÓN CELULAR.  
RELACIÓN CON LA PATOGENICIDAD VIRAL**

TESIS DOCTORAL

ARIEL RODRIGUEZ

Mayo, 2009



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

Departamento de Biología Molecular

**ACOPLAMIENTO FUNCIONAL ENTRE EL VIRUS DE LA GRIPE  
Y LA MAQUINARIA DE TRANSCRIPCIÓN CELULAR.  
RELACIÓN CON LA PATOGENICIDAD VIRAL**

TESIS DOCTORAL

Memoria presentada por  
Ariel Rodriguez  
Para optar al título de Doctor  
Madrid, Mayo 2009





El trabajo presentado en esta Memoria ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular y Celular del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC), bajo la dirección de la Dra. Amelia Nieto Martín.

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias al disfrute de una beca de la Fundación Carolina y una beca predoctoral de Formación de Personal Universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia.

















# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	21
<b>SUMMARY</b>	27
<b>INTRODUCCIÓN</b>	31
<b>1.- EL VIRUS DE LA GRIPE</b>	33
1.1.- Historia	33
1.2.- Clasificación y nomenclatura	33
1.3.- La partícula viral	34
1.3.1.- Las proteínas virales	34
1.4.- Genoma y RNAs virales presentes en la célula infectada	37
1.4.1.- El genoma viral	37
1.4.2.- vRNAs o RNAs genómicos	38
1.4.3.- cRNAs o RNAs complementarios	39
1.4.4.- mRNAs o RNAs mensajeros	39
1.5.- La ribonucleoproteína viral	40
1.5.1.- La polimerasa	40
1.5.2.- La subunidad PB1	42
1.5.3.- La subunidad PB2	43
1.5.4.- La subunidad PA	43
1.5.5.- La nucleoproteína	45
<b>2.- EL CICLO DE INFECCIÓN DEL VIRUS DE LA GRIPE</b>	46
2.1.- Adsorción y entrada de las partículas virales	46
2.2.- Transcripción y replicación del RNA viral	46
2.2.1.- La transcripción	48
2.2.2.- La replicación	48
2.3.- Procesamiento de los RNAs y síntesis de proteínas virales	49
2.4.- Transporte de las RNPs al citoplasma. Formación y liberación de nuevas partículas virales	49
<b>3.- FACTORES CELULARES ASOCIADOS A COMPONENTES DEL     VIRUS DE LA GRIPE</b>	51
3.1.- Factores implicados en el tráfico intracelular de componentes virales	51
3.2.- Factores que forman parte de estructuras nucleares	54
3.3.- Factores implicados en la transcripción y replicación viral	55

3.4.- Factores implicados en la traducción viral	56
3.5.- Proteínas celulares implicadas en otras funciones	56
3.6.- Proteínas celulares presentes los viriones del virus de la gripe	57
<b>4.- PATOGENESIS Y RANGO DE HOSPEDADOR DEL VIRUS DE LA GRIPE</b>	57
4.1.- Las glicoproteínas virales HA y NA	59
4.1.2.- Los componentes de la RNP	60
4.1.3.- La proteína NS1 como antagonista de la respuesta antiviral	61
4.1.4.- La proteína pro-apoptótica PB1-F2	61
<b>5.- BÚSQUEDA DE FACTORES CELULARES QUE INTERACIONARAN CON PA</b>	61
<b>6.- LA TRANSCRIPCIÓN CELULAR</b>	63
6.1.- El CTD de la RNAP II desempeña un papel fundamental	64
6.2.- Etapas de la transcripción celular	64
6.2.1.- Iniciación de la transcripción	64
6.2.2.- Elongación de la transcripción	65
6.2.3.- <i>Capping</i> del mRNA	65
6.2.4.- <i>Splicing</i>	66
6.2.5.- Poliadenilación	66
6.2.6.- Terminación de la transcripción	67
6.2.7.- Reciclaje	67
<b>OBJETIVOS</b>	71
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	75
<b>MATERIALES BIOLÓGICOS</b>	77
<b>1.- LÍNEAS CELULARES EUCARIOTAS</b>	77
<b>2.- ESTIRPES BACTERIANAS</b>	77
<b>3.- VIRUS</b>	77
3.1.- Cepas de virus de la gripe de laboratorio	77
3.2.- Cepas de virus de la gripe de campo	77
3.3.- Virus de la gripe recombinantes	77
3.4.- Otros virus	77
<b>4.- PLÁSMIDOS</b>	77
4.1.- Plásmidos para la reconstitución de RNPs	77
4.2.- Plásmidos para rescate de virus recombinantes	78
4.3.- Plásmidos para la silenciamiento génico	78
4.4.- Otros plásmidos	78

<b>5.- ANTICUERPOS</b>	78
5.1.- Anticuerpos primarios	78
5.2.- Anticuerpos secundarios	79
<b>6.- REACTIVOS Y DROGAS</b>	79
<b>MÉTODOS</b>	79
<b>7. MANIPULACIÓN DE DNA Y CLONAJES</b>	79
7.1.- Plásmidos de silenciamiento	79
7.1.1.- pSUPER-hCLE 121-143, pSUPER-hCLE 417-435, pSUPER-hCLE 624-642 y pSUPER-TM	79
7.1.2.- pSR-PURO-hCLE 121-143 y pSR-PURO-TM	80
<b>8.- MANIPULACIÓN DE CULTIVOS CELULARES</b>	80
8.1.- Mantenimiento de cultivos celulares	80
8.2.- Transfecciones	80
8.3.- Infecciones	81
8.4.- Aislamiento de núcleos	81
8.5.- Reconstitución de RNPs <i>in vivo</i>	81
8.6.- Generación de líneas celulares estables	82
<b>9.- TÉCNICAS VIROLÓGICAS</b>	82
9.1.- Generación de <i>stocks</i> de trabajo	82
9.2.- Titulación de virus mediante ensayo de placa	82
9.3.- Curvas de crecimiento	83
9.4.- Inmunomicroscopia electrónica de células infectadas	83
9.5.- Rescate de virus recombinantes	84
<b>10.- MANIPULACIÓN DE RNA</b>	84
10.1.- Síntesis de RNA <i>in vitro</i> en núcleos aislados	84
10.2.- Aislamiento de RNA total celular para análisis por <i>Northern blot</i>	85
10.3.- Detección y cuantificación de RNAs virales por <i>Northern blot</i>	85
10.4.- Detección y cuantificación de mRNAs celulares por <i>Dot blot</i>	86
<b>11.- PREPARACIÓN DE SONDAS PARA HIBRIDACIÓN</b>	86
11.1.- Sondas de oligonucleótidos	86
<b>12.- ANÁLISIS DE PROTEÍNAS</b>	86
12.1.- Marcaje metabólico <i>in vivo</i> de proteínas virales	86
12.2.- Determinación vida media de la RNAP II	86
12.3.- Inmunoprecipitación de proteínas	87

12.4.- <i>Western blot</i>	87
<b>RESULTADOS</b>	91
<b>1.- ESTUDIO DE LA RELEVANCIA FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA</b>	93
<b>CELULAR hCLE EN LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA GRIPE</b>	
1.1.- Optimización del silenciamiento de hCLE	93
1.2.- Análisis del efecto de la disminución de hCLE en la actividad de RNPs recombinantes	94
1.2.1.- Optimización de los tiempos de transfección de los componentes de la RNP post-silenciamiento de hCLE	95
1.2.2.- Análisis de la actividad de las RNPs recombinantes durante el silenciamiento de hCLE	96
1.3.- Estudio del efecto que el silenciamiento de hCLE tiene en la infección por el virus de la gripe	97
1.3.1.- Estudio de la síntesis de proteínas virales en células con hCLE silenciada	97
1.3.2.- Análisis de la acumulación de proteínas virales en condiciones de silenciamiento de la proteína hCLE	98
1.3.4.- Análisis de la producción de virus en infección a alta multiplicidad en células con hCLE silenciada	98
1.3.5.- Análisis de la producción de virus en infecciones a baja multiplicidad con el virus de la gripe en células con hCLE silenciada	99
1.4.- Estudio del efecto que la infección por el virus de la gripe tiene sobre la proteína celular hCLE	100
1.5.- Estudio de la incorporación de hCLE en viriones	100
<b>2.- ESTUDIO DEL EFECTO QUE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA GRIPE TIENE SOBRE LA MAQUINARIA DE TRANSCRIPCIÓN CELULAR</b>	102
2.1.- Estudio del efecto de la infección por el virus de la gripe sobre la subunidad mayor del complejo de la RNAP II	102
2.2.- Análisis de la influencia de la cepa viral y el origen del tipo celular en la degradación de la forma hipofosforilada de la RNAP II	105
2.3.- Estudio de la relación entre la degradación y la actividad de la RNAP II	106
2.4.- Análisis del patrón de transcripción y replicación del RNA viral	107
2.5.- Estudio de la implicación del proteosoma en la degradación de la forma hipofosforilada de la RNAP II	108

2.6.- Determinación de las proteínas virales implicadas en la degradación de la RNAP II	109
2.7.- Estudio de la implicación de la actividad proteolítica de PA en la degradación de la RNAP II	110
2.8.- Estudio de la capacidad de la cepa vacunal PR8 para degradar la RNAP II	111
2.9.- Análisis de la influencia del origen del tipo celular en la incapacidad de la cepa PR8 para inducir la degradación de la RNAP II	112
2.10.- Estudio de la relevancia de la asociación RNAP II-polimerasa viral en la degradación de la RNAP II	113
2.11.- Estudio de la capacidad para degradar e inhibir la actividad de la RNAP II por diferentes cepas del virus de la gripe	113
2.12.- Análisis de la contribución de la transcripción y replicación viral a la degradación de la RNAP II	114
2.13.- Estudio de la capacidad de degradación de la RNAP II por distintas cepas de laboratorio del virus de la gripe	115
2.14.- Análisis de la capacidad de degradación de la RNAP II por la cepa vacunal A/Ann Arbor/6/60 <i>cold-adapted</i>	116
2.15.- Estudio de la capacidad de degradación de la RNAP II por diferentes aislados naturales del virus de la gripe	116
2.16.- Estudio de la relación entre la capacidad de degradación de la RNAP II y la patogenicidad viral	118
2.17.- Generación de virus recombinantes con intercambio del segmento de PA entre las cepas VIC, WSN y PR8	118
2.18.- Estudio de la implicación de la subunidad PA de la polimerasa viral en la degradación de la RNAP II	120
<b>DISCUSIÓN</b>	123
<b>1.- ESTUDIO DE LA RELEVANCIA FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA CELULAR hCLE EN LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA GRIPE</b>	125
1.1.- Efecto de la proteína celular hCLE sobre la expresión génica del virus de la gripe	126
1.2.- Efecto de la proteína celular hCLE sobre la producción de partículas virales	127
1.3.- Incorporación de la proteína celular hCLE en viriones del virus de la gripe	128
1.4.- Efectos pleiotrópicos de hCLE en la infección por el virus de la gripe	130
<b>2.- ESTUDIO DEL EFECTO QUE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA GRIPE TIENE SOBRE LA MAQUINARIA DE TRANSCRIPCIÓN CELULAR</b>	131

2.1.- Efecto de la infección por el virus de la gripe sobre la maquinaria de transcripción celular	131
2.2.- Relación entre la degradación de la RNAP II y la patogenicidad	134
2.3.- ¿Quién es el responsable de la degradación de la subunidad mayor de la RNAP II?	135
<b>3.- CONSIDERACIONES FINALES</b>	137
<b>CONCLUSIONES</b>	141
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	145
<b>ANEXO: Publicaciones</b>	181









**AraC**: Citosina  $\beta$ -D-Arabinofuranósido

**ATCC**: *American Type Culture Collection*

**Backtracking**: Marcha atrás en la transcripción mediante la cual la RNAP II rompe enlaces erróneos con su actividad exonucleasa

**band shift**: desplazamiento de banda por retraso en la movilidad electroforética

**BSA**: Seroalbúmina bovina

**Cap snatching**: Proceso mediante el cual la polimerasa viral roba las estructuras cap de los mRNAs celulares

**CAT**: Cloranfenicol acetiltransferasa

**CDK**: Kinasa dependiente de ciclina

**cDNA**: DNA complementario

**cold-adapted**: Cepa viral adaptada a la multiplicación a bajas temperaturas

**cpm**: Cuentas por minuto

**cRNA**: RNA complementario

**CTD**: *Carboxy terminal domain*

**C-terminal**: Carboxi terminal

**Ctr.**: Control

**Cys**: Cisteína

**deINS1**: Virus PR8 rescatado al que le falta el gen NS1

**DEPC**: Dietil pirocarbonato

**DMEM**: *Dulbecco Modified Eagle Medium*

**DNA**: Ácido desoxirribonucleico

**Eng**: Cepa A/England/1/51

**FBS**: Suero fetal bovino

**hpi**: Horas post-infección

**h**: hora

**hvPR8**: virus PR8 de alta patogenicidad

**IvPR8**: virus PR8 de baja patogenicidad

**KV**: Kilovoltios

**Met**: Metionina

**min**: Minuto

**ml**: mililitro

**mm**: milímetro

**moi**: *multiplicity of infection* o multiplicidad de infección

**mRNA**: RNA mensajero

**NC**: Cepa A/New Caledonia/20/99

**NES**: *Nuclear export signal* o señal de exportación nuclear

**NLS**: *Nuclear localization signal* o señal de localización nuclear

**nm**: nanometro

**nt**: Nucleótido

**N-terminal**: Amino terminal

**ORF**: *Open Reading Frame* o marco de lectura abierto

**PAT157A:** Virus rescatado con la mutación T157A en la subunidad PA

**PAwt:** Virus rescatado con la subunidad PA tipo salvaje

**Panhandle:** Estructura en mango de sartén

**PBS:** Tampón fosfato salino

**PBSc:** PBS completo

**pfu:** *plaque forming unit* o unidades formadoras de placa

**PR8:** Cepa A/PR8/8/34

**pre-mRNA:** Precursor del RNA mensajero

**Promoter clearance:** Evacuación del promotor

**Reassortment:** Mezcla del material genético de dos virus que infectan la misma célula

**RNA:** Ácido ribonucleico

**RNP:** Ribonucleoproteína

**RNAP II:** RNA polimerasa II

**rpm:** Revoluciones por minuto

**RT:** *Room temperatura* o temperatura ambiente

**SDS:** Dodecil sulfato sódico

**SDS-PAGE:** Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS

**siRNAs:** *small interfering RNA* o RNAs pequeños interferentes

**Shut off:** Proceso por el cual se inhibe la expresión de los mRNAs celulares durante la infección viral

**Shuttling protein:** Proteína lanzadera

**siRNA:** RNA pequeño interferente

**Speckles:** Estructuras subnucleares ricas en factores de *splicing*

**snRNPs:** Partículas ribonucleoproteicas pequeñas nucleares

**Spliceosome:** complejo macromolecular que contiene la maquinaria de *splicing*

**Splicing:** procesamiento del pre-mRNA por el que se eliminan secuencias intrónicas por corte y empalme

**Surveillance:** Control de calidad del RNA mensajero durante la transcripción

**TBS:** Tampón tris salino

**Transcript slippage:** Proceso por el cual la RNAP II “patina” antes de elongar de manera procesiva

**Transcriptional arrest:** Parada larga de la RNAP II tras superar el promotor

**ts:** Termosensible

**Upstream:** Término relativo de lugar que indica que algo se encuentra más cercano al extremo 5' de la cadena molde del DNA que otra cosa.

**VIC:** Cepa A/Victoria/3/75

**VLPs:** *virus like-particles* o partículas similares a virus.

**vRNA:** RNA genómico viral

**vRNP:** RNP viral

**vTF7-3:** Virus Vaccinia recombinante que expresa la polimerasa del fago T7

**WB:** *Western blot*

**WSN:** Cepa A/WSN/33

**wt:** *Wild type* o tipo silvestre  
**Wy:** Cepa A/Wyoming/3/2003  
**μCi:** Microcurio  
**μg:** Microgramo  
**μl:** Microlitro











Influenza virus polymerase is a heterotrimeric complex consisting of three subunits PB1, PB2 and PA. The polymerase, together with the nucleoprotein and the viral RNA, forms viral ribonucleoproteins (RNPs) that carry out viral transcription and replication. In a previous search for cellular associated factors using PA as bait in a yeast two-hybrid system, two proteins were identified: CHD6 and hCLE. hCLE co-immunoprecipitates with different phosphorylated forms of the RNAP polymerase II (RNAP II) and is a positive modulator of its activity. Since viral and cellular transcriptions are functionally coupled, we studied the possible role of hCLE protein during influenza virus infection. We have observed that the activity of reconstituted viral RNPs in hCLE-silenced cells is decreased. On the other hand, hCLE silencing has little effect on viral particles production and viral protein synthesis. However, the accumulation levels of hCLE protein increase along the infection and by immune electron microscopy we observe the presence of hCLE in viral particles released from infected cells.

Recently, It has been described that influenza virus polymerase associates with RNAP II. To gain information about the role of this interaction, we explored if changes in RNAP II occur during infection. We observe that influenza virus infection causes the specific degradation of the hypophosphorylated form of the largest subunit of RNAP II without affecting the accumulation of its hyperphosphorylated forms. The analysis of synthesized mRNAs in isolated nuclei of infected cells indicates that cellular transcription decreases concomitantly with RNAP II

degradation. Furthermore, the expression of viral polymerase from its cloned cDNAs is sufficient to cause the degradation and a recombinant virus that encodes a PA point mutant with decreased proteolytic activity delays the effect, suggesting a contribution of PA subunit to the RNAP II degradation process. To evaluate if this process is a general feature of virulent viruses, we studied the behavior of the influenza virus strains A/PR8/8/34 (PR8) and the cold-adapted A/Ann Arbor/6/60, which are currently used as the donor strains for vaccine seeds due to their attenuated phenotype. We have observed that upon infection with these strains, degradation of the RNAP II does not occur. Moreover, by run-off experiments we observe that PR8 has a reduced ability to inhibit cellular mRNA transcription. In addition, a hyper-virulent PR8 variant that multiplies much faster than standard PR8 in infected cells and is more virulent in mice than the parental PR8 virus efficiently induces RNAP II degradation. When infection with natural human and avian isolates was examined, we observed that all these viruses efficiently induce the proteolytic process. Finally, we have observed that reassortant viruses with exchanged PA between strains that induce degradation and PR8 have a concomitant increased or decreased ability to degrade the RNAP II. Together, the data indicate that PA protein is involved in the RNAP II degradation process and that the capacity of the influenza virus to degrade RNAP II and inhibit the host-cell transcription machinery is a feature of influenza A viruses that might contribute to its virulence.







## 1.- EL VIRUS DE LA GRIPE

### 1.1.- Historia

La gripe es una enfermedad respiratoria aguda, altamente contagiosa, que ha afectado al ser humano desde tiempos inmemoriales, produciendo epidemias anuales y pandemias ocasionales. Existen documentos históricos en los que se hace referencia a la aparición repentina de enfermedades respiratorias que persisten durante días o semanas y desaparecen tan repentinamente como aparecieron. En el texto más antiguo, que data del año 412 a.C., Hipócrates describe una posible epidemia gripal. Desde entonces se conocen numerosos episodios de gripe de distinta virulencia y repercusión en la población (Wright, 2001). La gripe es una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad en el mundo y una gran parte de la población humana es afectada cada año. Además, muchas especies animales pueden ser infectadas por el virus de la gripe, algunas veces con consecuencias catastróficas. La mayor amenaza es la posibilidad de otra pandemia similar a la ocurrida en 1918, que se estima que causó 50 millones de muertos en todo el mundo (Johnson and Mueller, 2002).

El agente causal de esta enfermedad permaneció desconocido hasta principios de los años 1930, cuando Richard E. Shope sugirió que éste debía ser un virus, ya que podía transmitirse a través de filtros (Shope, 1931). En 1933 Wilson Smith, Sir Christopher Andrews y Sir Patrick Laidlaw realizaron el primer aislado de un virus de la gripe a partir de una persona infectada (Smith, 1933). La infección por el virus de la gripe provoca síntomas severos entre los que se incluyen fiebre alta (39-

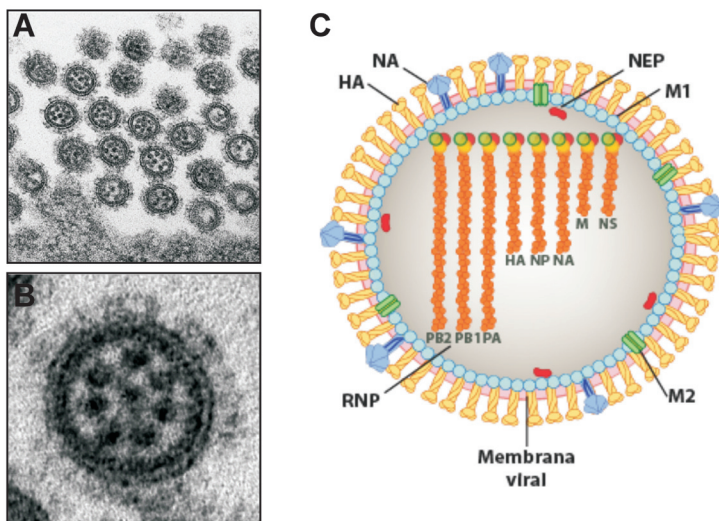
40°C), dolor de cabeza, postración y dolor muscular. Además, la gripe puede ocasionar posteriores infecciones virales o bacterianas del tracto respiratorio inferior, provocando neumonía. Todos estos hechos hacen que tanto el estudio a nivel molecular como el control epidemiológico del virus sean de una gran importancia e interés.

### 1.2.- Clasificación y nomenclatura

El virus de la gripe pertenece a la familia *Orthomyxoviridae* dentro del grupo V de la clasificación de Baltimore (Baltimore, 1971). Esta familia se caracteriza por tener una envuelta lipídica y poseer un genoma segmentado de moléculas de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa. Mientras que el nombre de la familia proviene de su capacidad hemaglutinante o de unión a mucus (del griego *myxo*), el nombre del género *influenza* (en latín *influentia*) significa epidémico y fue utilizado originalmente por relacionar el origen de epidemias con influencias astrológicas.

La familia *Orthomyxoviridae* incluye varios géneros: *Influenzavirus A*, que infecta humanos, otros mamíferos y una gran variedad de aves; *influenzavirus B*, que únicamente infecta humanos; *influenzavirus C*, que infecta humanos, perros y cerdos; *Thogoto-like virus* que incluye los virus Thogoto y Dhori; y el género *Isavirus*, cuyo componente más importante es el virus de la anemia del salmón.

Los géneros A, B y C se distinguen entre sí por las diferencias antigénicas presentes en las moléculas de nucleoproteína (NP) y en la proteína mayoritaria de la matriz, M1. Además, los *influenzavirus* tipo A se dividen en subtipos basándose en la



**Figura 1. La partícula viral**

**A.** Micrografía electrónica de secciones ultrafinas en la que se observan partículas del virus de la gripe emergiendo desde una célula infectada. Tomado de Noda et al., 2006. **B.** Imagen magnificada de una partícula de A en la que resultan aparentes las proyecciones de las glicoproteínas desde la membrana y la posición de las ocho RNPs. **C.** Esquema de la partícula viral en la que se indican las proteínas estructurales del virus.

naturaleza antigénica de las glicoproteínas hemagglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). En cuanto a su nomenclatura, incluye el hospedador de origen, la localización geográfica del aislado, el número de cepa y el año de aislamiento. La descripción antigénica de la hemagglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) viene dado entre paréntesis, pe: A/Swine/Iowa/15/30 (H1N1). Por convención, cuando el hospedador de origen es el ser humano no se incluye, pe: A/Victoria/3/75 (H3N2).

A lo largo de esta tesis se va a hacer referencia únicamente al género *influenzavirus* A, ya que es el que más severamente afecta a humanos y constituyen el principal modelo de estudio del laboratorio.

### 1.3.- La partícula viral

Los viriones presentan una morfología pleiomórfica y heterogénea aunque con tendencia a adquirir formas esféricas o

filamentosas dependiendo de la cepa y el tipo de célula hospedadora (Horne et al., 1960; Hoyle et al., 1961). Su diámetro está comprendido entre 80 y 120nm, aunque los filamentosos, que son los mas frecuentemente observados en preparaciones clínicas, pueden llegar hasta los 300nm. Poseen una envuelta lipídica derivada de la membrana plasmática de las células infectadas (Compans, 1975) y al ser observados al microscopio electrónico mediante tinción negativa se observan unas espículas en dicha membrana de una longitud de 10 a 14nm. Estas espículas son las glicoproteínas de membrana HA y NA. Las proteínas HA y NA son abundantes, siendo HA mayoritaria en la membrana, mientras que la proteína M2 está presente sólo en unas pocas copias por virión (Zebedee and Lamb, 1988) (**Figura 1**).

#### 1.3.1.- Las proteínas virales

Como se ha dicho anteriormente, en la

envuelta del virión se encuentran la proteína M2 y las glicoproteínas de membrana HA y NA (**Figura 1**). La proteína **HA** forma un homotrímero (Weis et al., 1988) cuya estructura globular y función están muy conservadas en todos los virus a pesar de la evolución y variación de secuencia. Las funciones mas importantes de HA son el reconocimiento del receptor celular (el ácido siálico) y la interacción con la membrana celular para permitir la entrada del virus (Weis et al., 1988). Debido a un cambio conformacional dependiente de pH en su estructura, se produce la fusión de la envuelta del virus y la membrana lisosomal para permitir la penetración del genoma viral en la célula infectada (Bullough et al., 1994). La proteína **NA** forma un homotetrámero (Colman et al., 1983; Varghese et al., 1983) y presenta forma de bastón. Esta proteína tiene actividad neuraminidasa y su función en el ciclo celular es eliminar el ácido siálico presente en las glicoproteínas de la membrana celular. De esta forma se permite la liberación de los nuevos viriones al espacio extracelular (Palese and Compans, 1976; Palese et al., 1974). HA y NA son los dos determinantes antigénicos contra los que se dirige la respuesta inmunológica humoral neutralizante. Dentro de los virus tipo A se han descrito 16 subtipos de HA y 9 de NA. La combinación de los distintos subtipos determina la gran variabilidad presente dentro de los virus tipo A (WHO, 1979) y, como se comentará mas adelante, tiene un papel muy importante en la determinación el rango de hospedador, la patogenicidad y la virulencia de las distintas cepas (Nicholls et al., 2008; Yamada et al., 2006a). Por su parte, la proteína **M2** está presente en forma de

homotetrámero (Holsinger and Lamb, 1991) y forma canales iónicos (Pinto et al., 1992) de gran importancia para la correcta infectividad de las partículas virales, ya que este canal se encarga de conducir los protones desde los endosomas acidificados hasta el interior del virus para dar lugar a la disociación del complejo de ribonucleoproteínas (RNPs) del resto de proteínas virales. M2 también está implicada en la alteración de la relación entre partículas filamentosas y esféricas (Roberts et al., 1998) y en el ensamblaje y liberación de los viriones (Hughey et al., 1995; Schroeder et al., 2005).

Bajo la envuelta se encuentra el armazón proteico del virus, compuesto principalmente por **M1** que es la proteína más abundante en el virión y presenta interacción tanto con los tallos citoplásmicos de las proteínas de la envuelta como con las RNPs (Enami and Enami, 1996; McCown and Pekosz, 2006; Ye et al., 1987) y con la proteína NEP (Yasuda et al., 1993), antes llamada NS2. M1 tiene la capacidad de formar homooligómeros, forma estructuras ordenadas con los residuos cargados positiva y negativamente en caras opuestas (Arzt et al., 2001; Harris et al., 2001) y es el factor mínimo necesario para la formación de *virus like-particles* (VLPs) (Gómez-Puertas et al., 2000). Una de sus superficies está fuertemente cargada positivamente (Sha and Luo, 1997) y es probablemente responsable de la unión al RNA (Ye et al., 1989; Ye et al., 1987), mientras que la superficie opuesta es hidrofóbica y sería responsable de la interacción con membranas. Se ha propuesto que M1 tiene un papel clave en el ensamblaje de los viriones ya que podría reclutar los componentes virales hasta el sitio de

Segmento	Longitud <sup>1</sup>	Proteína	Tamaño <sup>2</sup>	Abundancia <sup>3</sup>	Funciones
1	2341	PB2	759	30-40	Unión a cap Iniciación transcripción
2	2341	PB1	757	30-40	Polimerasa
		PB1-F2	87		Unión a la mitocondria Apoptosis
3	2233	PA	716	30-40	Proteasa Endonucleasa Replicación
4	Aprox. 1770	HA	Aprox. 566	500	Hemaglutinina Unión al receptor Proteína de fusión Respuesta inmune
5	1565	NP	498	1000	Proteína de la nucleocápsida Replicación Encapsidación
6	Aprox. 1413	NA	Aprox. 454	100	Neuraminidasa Destrucción del receptor Respuesta inmune
7	1027	M1	252	3000	Unión de la nucleocápsida a la membrana
		M2	96	50	Canal iónico Fusión de las membranas
8	890	NS1	Aprox. 230		Modulación de la expresión génica Virulencia
		NEP	121	50	Exportación de la nucleocápsida del núcleo

**Tabla I. Características de los genes y las proteínas expresadas por el virus de la gripe tipo A.**

<sup>1</sup>.- Longitud en nucleótidos. <sup>2</sup>.- Tamaño en aminoácidos. <sup>3</sup>.- Abundancia en la partícula viral.

ensamblaje en la membrana plasmática. La proteína **NEP** (*Nuclear Export Protein*) es la proteína estructural menos abundante en el virión (Richardson and Akkina, 1991). Esta proteína interacciona con el receptor de exportación nuclear CRM1 (Neumann et al., 2000), con varias nucleoporinas (O'Neill et al., 1998) y, junto con M1, está implicada en la salida de las RNPs al citoplasma (O'Neill et al., 1998). Además, recientemente se ha descrito que esta proteína regula los niveles de transcripción y replicación viral (Robb et al., 2009). En el interior de la partícula viral se encuentra las ribonucleoproteínas (**RNPs**). Estos complejos contienen el

genoma del virus superenrollado (Hsu et al., 1987) junto con la polimerasa viral, compuesta por las subunidades PB1, PB2 y PA, y la nucleoproteína (NP) (Klump et al., 1997) y forman las unidades básicas funcionales que llevan a cabo los procesos de transcripción y replicación en el núcleo de la célula infectada. En la estructura y función de la polimerasa y las RNPs nos centraremos más adelante.

Hay dos proteínas no estructurales del virus y que, por tanto, no están presentes en la partícula viral. Estas dos proteínas son NS1 y PB1-F2. **NS1** se sintetiza a partir del transcrito colineal del segmento 8 y se le atribuyen un gran



número de funciones en distintas etapas de la infección, como la inhibición de la respuesta inmune celular (Bucher et al., 2004; Cheng et al., 2009; Guo et al., 2007; Hatada et al., 1999; Kochs et al., 2007; Li et al., 2004b; Mibayashi et al., 2007; Min and Krug, 2006; Pichlmair et al., 2006; Tan and Katze, 1998), la inhibición del *splicing* de los mRNAs celulares (Garaigorta and Ortin, 2007; Qiu et al., 1995), la inhibición del procesamiento del extremo 3' de los pre-mRNAs (Chen et al., 1999), la inhibición del transporte de los mRNAs (Fortes et al., 1994; Katze and Krug, 1984; Qian et al., 1994; Qiu and Krug, 1994; Satterly et al., 2007), la modulación de la actividad de la polimerasa viral (Falcón et al., 2004; Garaigorta et al., 2005; Hatada and Fukuda, 1992; Hatada et al., 1997; Hatada et al., 1992; Marion et al., 1997), la estimulación de la traducibilidad de los mRNAs virales (de la Luna et al., 1995; Enami et al., 1994; Garfinkel and Katze, 1992, 1993; Katze and Krug, 1990; Park and Katze, 1995; Yamanaka et al., 1991) o la morfogénesis viral (Garaigorta et al.,

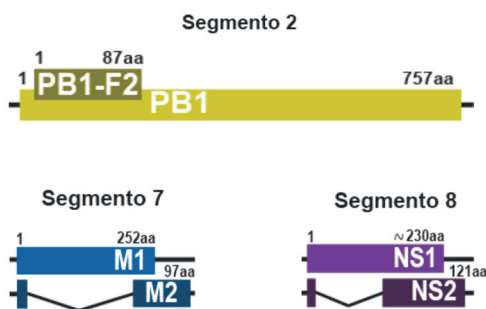
2005). La proteína **PB1-F2** se localiza preferencialmente en las mitocondrias de la célula infectada. Se le ha relacionado con procesos de apoptosis durante la infección (Chen et al., 2001; Zamarin et al., 2005), y es un importante factor de patogenicidad (Zamarin et al., 2006) que favorece la aparición de enfermedades bacterianas secundarias (McAuley et al., 2007) y regula la actividad de la polimerasa mediante la interacción con la subunidad PB1 (Mazur et al., 2008).

En la **TABLA I** se indican algunas de las características de las diferentes proteínas virales así como su abundancia relativa en el virión.

#### 1.4.- Genoma y RNAs virales presentes en la célula infectada

##### 1.4.1.- El genoma viral

El genoma del virus de la gripe tipo A está formado por 8 segmentos de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa (Inglis et al., 1976) cuya longitud oscila entre 2341 y 890 nucleótidos, por lo que el genoma completo comprende alrededor

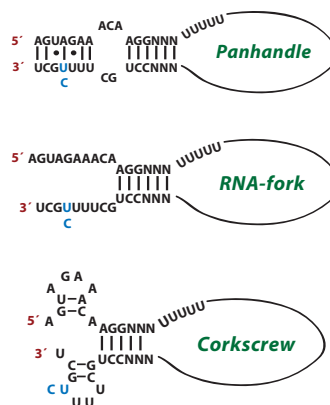


**Figura 2. Expresión de proteínas virales a partir de *splicing* y ORF alternativos.**

La figura muestra las proteínas PB1 y PB1-F2, que se producen a partir del mRNA del segmento 2 por utilización de un marco de lectura alternativo. También se muestran las estructuras de los mRNAs de los segmentos 7 y 8, que codifican las proteínas M1 y NS1 respectivamente, así como los RNAs mensajeros procesados por *splicing* que derivan de ellos y dan lugar a las proteínas M2 y NS2 respectivamente. Se indican las posiciones de los marcos de lectura abierta de proteínas como rectángulos continuos. En los mRNAs procesados se indican los exones como rectángulos, entre los que se señalan los intrones como líneas quebradas.

de 13500 nucleótidos y codifica un total de 11 proteínas. Cada segmento genómico da lugar a una única proteína excepto los segmentos 2, 7 y 8 que codifican dos proteínas cada uno (Chen et al., 2001; Lamb and Choppin, 1979, 1981; Lamb et al., 1980; Lamb and Lai, 1980; Lamb et al., 1981). Los segmentos 7 y 8 expresan dos proteínas cada uno mediante traducción colineal del RNA no procesado (proteínas M1 y NS1) y por el procesamiento de sus mRNAs por *splicing* (proteínas M2 y NS2 respectivamente) (Lamb and Choppin, 1979; Lamb et al., 1981). El mRNA del segmento 2 contiene dos marcos de lectura abierta (ORF) a partir de los cuales se expresan las proteínas PB1 y PB1-F2 (Chen et al., 2001) (**Figura 2**).

Las secuencias terminales en los extremos 5' y 3' de los RNAs genómicos son conservadas y parcialmente complementarias. Estas secuencias presentan complementariedad parcial e invertida (Robertson, 1979; Skehel and Hay, 1978), lo que les permite aparearse entre sí. Además, están asociadas al complejo de la polimerasa (Klumpp et al., 1997). Tras el estudio de la estructura de los extremos de los RNAs mediante predicciones de su plegamiento, experimentos de mutagénesis y de resonancia magnética nuclear, se han propuesto modelos tipo *panhandle* o mango de sartén (Bae et al., 2001; Baudin et al., 1994; Desselberger et al., 1980; Hsu et al., 1987; Robertson, 1979), *fork* o tenedor (Fodor et al., 1995; Kim et al., 1997b) y *corkscrew* o sacacorchos (Flick and Hobom, 1999; Flick et al., 1996) para la zona de interacción entre los extremos (Cheong et al., 1999; Flick and Hobom, 1999; Fodor et al., 1994; Hsu et al., 1987) (**Figura 3**). Sin embargo, el esclarecimiento



**Figura 3. Estructura del promotor del RNA viral.**

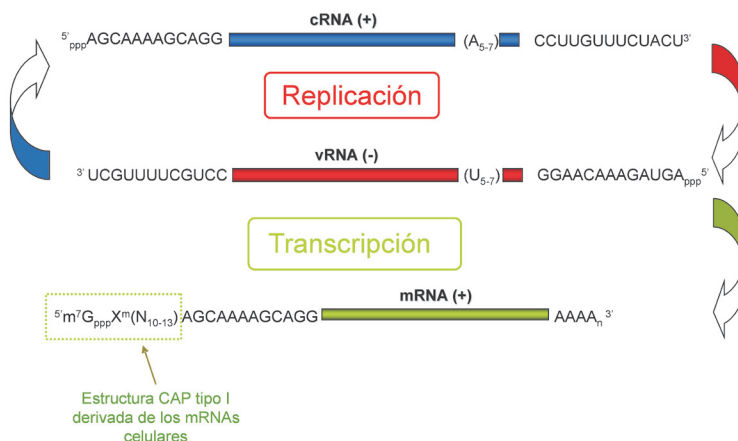
Se muestran las distintas posibilidades para la estructura del promotor de transcripción-replicación del RNA viral. En todas ellas, los extremos 5' y 3' del RNA se asocian entre sí, determinando una conformación circular. **Arriba**, se muestra el modelo *panhandle* o "mango de sartén" que ha sido determinado por RMN. En el **centro** se muestra el modelo *fork* o "tenedor", mientras que **abajo** se muestra el modelo *corkscrew* o "sacacorchos".

de esta estructura no será posible hasta determinar a nivel atómico la estructura del complejo de la polimerasa asociado al molde.

Durante la infección por el virus de la gripe, dentro de la célula infectada, se pueden encontrar tres tipos de RNAs virales distintos, todos ellos generados por el complejo de la polimerasa viral. En la **Figura 4** se muestran en un esquema.

#### 1.4.2. vRNAs o RNAs genómicos

Son los RNAs que proceden inicialmente de las RNPs parentales y también los que se encapsidan para dar lugar a las RNPs de la nueva progenie viral. Por lo tanto, es un RNA de cadena sencilla y polaridad negativa. Los extremos del vRNA son 5' -pppN y 3' -OH (Young and Content, 1971) y cerca del extremo 5' tiene un tramo corto de entre 5 y 7 uridinas, que constituyen la



**Figura 4. RNAs virales presentes en la célula infectada.**

En la célula infectada se producen tres tipos de RNA para cada uno de los segmentos virales: vRNA, de polaridad negativa; mRNA y cRNA, ambos de polaridad positiva. Se muestra la posición de la señal de poliadenilación  $U_{5-7}$  en el vRNA, los extremos 3' y 5' del vRNA y cRNA que están conservados a lo largo de todos los segmentos, la presencia de trifosfato en los extremos 5' de los vRNA y cRNA, así como la estructura cap tipo I del mRNA viral y secuencias heterogéneas en el 5' del mRNA y poliA en su extremo 3'. Se indican también los procesos de replicación y transcripción.

señal de poliadenilación. Los 13 primeros nucleótidos del extremo 5' y los 12 últimos del extremo 3' son idénticos en todos los segmentos y permanecen invariables en todas las cepas de tipo A (Desselberger et al., 1980), excepto en la posición 4, en la que puede haber un cambio de uridina (U) a citosina (C). El vRNA se genera durante la infección a partir de un molde de cRNA o RNA complementario mediante el proceso de replicación y siempre se encuentra encapsidado por la proteína NP formando vRNPs que se empaquetan en los nuevos viriones.

#### 1.4.3. cRNAs o RNAs complementarios

Son una copia completa y de polaridad positiva del vRNA que se genera mediante el proceso de replicación (Hay et al., 1982). Los cRNAs son RNAs intermediarios de la replicación viral, ya que se utilizan como molde para generar copias de vRNA que serán incorporadas a la progenie viral. Al igual que el vRNA, en todo momento

se encuentra formando cRNPs, pero éstas nunca salen del núcleo de la célula infectada (Shapiro et al., 1987).

#### 1.4.4. mRNAs o RNAs mensajeros

Son el producto de la transcripción del vRNA llevada a cabo por la polimerasa viral, y por lo tanto, de polaridad positiva. Son copias incompletas ya que carecen de la zona complementaria al extremo 5' del vRNA. En su lugar, poseen una cola de poli (A) en su extremo 3' que se genera como consecuencia de la copia reiterada por parte de la polimerasa de un tramo de uridinas cercano al extremo 5' del molde vRNA. En su extremo 5' presenta un oligonucleótido heterogéneo de entre 10 y 13 nucleótidos de longitud que presenta estructura cap tipo I ( $\text{m}^7\text{GpppN}$ ) procedente de pre-mRNAs celulares transcritos por la RNA polimerasa II celular (RNAP II) (Krug et al., 1979). Estos oligonucleótidos con estructura cap los "roba" la polimerasa viral gracias a su actividad endonucleolítica

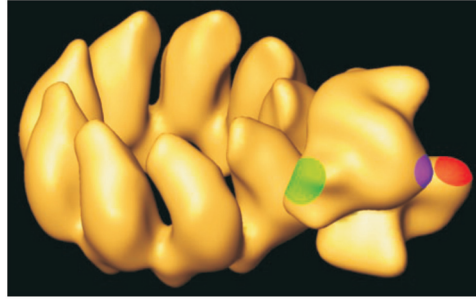
(Doan et al., 1999; Plotch et al., 1981) para utilizarlos como *primers* en la transcripción. Debido a las modificaciones de ambos extremos, los mRNAs virales y celulares son estructuralmente indistinguibles.

### 1.5.- La ribonucleoproteína viral

La forma activa en transcripción y replicación del genoma viral es la ribonucleoproteína (RNP), en la que cada segmento de vRNA o cRNA se encuentra individualmente encapsidado por la nucleoproteína (NP) y asociado a una copia de la RNA polimerasa RNA dependiente del virus formada por las subunidades PB1, PB2 y PA. Esta estructura de las RNPs ha sido confirmada por microscopía electrónica (Martín-Benito et al., 2001; Ortega et al., 2000). En estos modelos se distinguen los monómeros de NP que interactúan entre sí por la base de la estructura de la RNP de manera mucho más intensa que por la parte superior, lo que sugiere que es por esta zona por la que la NP interactúa con el RNA genómico. Además, los distintos monómeros de NP muestran una clara vorticidad que puede ser la base de la forma helicoidal que muestran las RNPs (**Figura 5**). La posición de dominios específicos de cada una de las tres subunidades de la polimerasa se ha determinado por la reconstrucción tridimensional de RNPs acopladas a anticuerpos monoclonales o con alguna etiqueta (Area et al., 2004). Estos datos indican que se encuentran expuestas la región N-terminal de PB2, la región C-terminal de PA y la región C-terminal de PB1.

#### 1.5.1.- La polimerasa

La polimerasa viral es una RNA polimerasa dependiente de RNA formada



**Figura 5. Modelo tridimensional de una ribonucleoproteína recombinante del virus de la gripe.**

Se muestra el modelo 3D de una RNP recombinante. La estructura circular contiene 9 monómeros de NP asociados entre sí y presumiblemente unidos al RNA viral. Asociado al anillo de NP se observa el complejo de la polimerasa viral que establece contactos diferenciales con los dos monómeros de NP adyacentes. Las áreas coloreadas indican la localización de dominios específicos de las subunidades de la polimerasa: en rojo la región N-terminal de PB2; en morado, la región C-terminal de PA y en verde, región C-terminal de PB1. Tomado de Area et al., 2004.

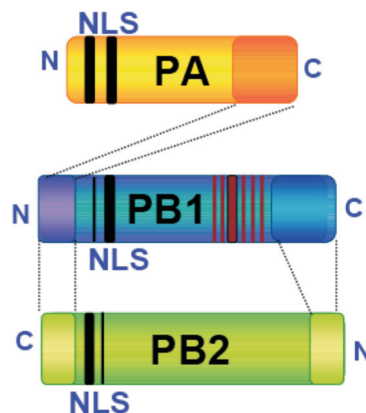
por un heterotrímero compuesto por las subunidades PB1, PB2 y PA (Detjen et al., 1987; Digard et al., 1989) con una relación estequiométrica 1:1:1 (Digard et al., 1989; Honda et al., 1990; Kato et al., 1985). Las tres subunidades son necesarias para llevar a cabo los procesos de transcripción y replicación viral en el núcleo de las células infectadas (Perales and Ortin, 1997).

En el heterotrímero, PB1 es la subunidad central (Digard et al., 1989) a la que se unen PB2 y PA. Esfuerzos de muchos grupos en los últimos años se han dirigido al estudio de las regiones de cada subunidad implicadas en la formación del complejo, utilizando técnicas muy variadas, como análisis de doble-híbrido y coimmunoprecipitación, ensayos de cromatografía de afinidad y de competición *in vivo* (Biswas and Nayak, 1996; González et al., 1996; Ohtsu et al., 2002; Perez and Donis, 1995; Poole et al., 2004; Toyoda et al., 1996; Zurcher et al.,

1996). En conjunto, estos experimentos indican que la región N-terminal de PB1 interacciona con la región C-terminal de PA y con el C-terminal de PB2 y que la región C-terminal de PB1 interacciona con la región N-terminal de PB2 (Biswas and Nayak, 1996; González et al., 1996; Ohtsu et al., 2002; Perez and Donis, 1995, 2001; Poole et al., 2004; Poole et al., 2007). Recientemente, mediante ensayos de complementación fluorescente bimolecular (BiFC), se ha observado que los 100 aminoácidos del N-terminal de la subunidad PA interaccionan con PB2 (Hemerka et al., 2009). Además, se ha descrito la oligomerización de los complejos triméricos de la polimerasa viral (Jorba et al., 2008a). El mapa de interacciones entre las tres subunidades se muestra en la **Figura 6**.

Se han obtenidos modelos de la estructura tridimensional de la polimerasa mediante microscopía electrónica, tanto para el complejo soluble (Torreira et al., 2007) como formando parte de la RNP (Area et al., 2004). En ambos casos se observa que las tres subunidades se encuentran asociadas y formando una estructura compacta, en la que podría darse la interacción entre las subunidades PA y PB2 recientemente descritas.

En cuanto a la interacción de la polimerasa con el RNA viral, se sabe que reconoce los extremos apareados del *panhandle* gracias a un conjunto de interacciones en las que intervienen tanto la estructura como la secuencia. Esta interacción con los extremos del RNA ayuda al mantenimiento de la estructura de la RNP, ya que la disociación del complejo por tratamiento con detergente provoca la pérdida de la estructura de *panhandle* y hace que el



**Figura 6. La polimerasa del virus de la gripe.**

Representación esquemática de la polimerasa del virus de la gripe en la que se indican las regiones de interacción entre las subunidades mediante líneas punteadas y se muestran las señales de localización nuclear (NLS) de cada subunidad. Los motivos dentro de PB1 relacionados con su actividad polimerasa se muestran en líneas rojas.

RNA se linearice (Klumpp et al., 1997). Mediante experimentos de *cross-linking* con luz ultravioleta se ha demostrado el contacto directo de PB1 y PB2 con el extremo 3' del vRNA así como la unión de las tres subunidades al extremo 5' (Fodor et al., 1994; Fodor et al., 1993) y ensayos *in vitro* han revelado las zonas de PB1 que están implicadas en la unión a vRNA y cRNA (González and Ortin, 1999a, b). La función del complejo formado por PB1, PB2 y PA como RNA polimerasa es llevar a cabo la transcripción y la replicación del RNA genómico viral. Experimentos de reconstitución de vRNPs y cRNPs activos *in vivo* a partir de cDNAs transfectados que expresan PB1, PB2 y PA indican que las tres subunidades son necesarias tanto para la transcripción como para la replicación, ya que la omisión de cualquiera de ellas elimina la actividad (Perales and Ortin, 1997). No obstante, experimentos *in vitro* muestran que PB1

aislada presenta cierta actividad polimerasa (Kobayashi et al., 1996; Nakagawa et al., 1996). También se ha descrito que PB1 junto con PB2 son suficientes para llevar a cabo transcripción *in vitro*, mientras que el dímero PB1-PA puede sintetizar RNA sin necesidad de un oligonucleótido cebador (Honda et al., 2002). Sin embargo, la relevancia de dichas actividades en el contexto de la célula infectada está aun por aclarar. La naturaleza exacta de los complejos de polimerasa implicados en la síntesis de cada especie de RNA todavía se desconoce.

Durante la infección, las tres subunidades de la polimerasa se acumulan en el núcleo de la célula infectada. Cada una de las tres subunidades posee sus propias señales de localización nuclear (NLS) y son capaces de transportarse al núcleo cuando se expresan de manera independiente (Akkinä et al., 1987; Jones et al., 1986; Mukaigawa and Nayak, 1991; Nath and Nayak, 1990; Nieto et al., 1994; Smith et al., 1987). Se ha observado que PA se nucleariza con retraso respecto a PB1 y PB2 (Akkinä et al., 1987; Briedis et al., 1981; Nieto et al., 1992). Sin embargo, no se conoce ni la localización intracelular ni la vía de formación del complejo. Se ha propuesto que PB1 y PA, junto con el factor celular RanBP5, forman un complejo en el citoplasma que se importa al núcleo mientras que PB2 lo hace de manera independiente (Deng et al., 2006). De este modo, una vez en el núcleo se formaría el complejo trimérico como sugieren experimentos *in vitro* (Deng et al., 2005). Aunque también existen datos que apoyan teorías en las que se propone la formación de dímeros entre la chaperona Hsp90 con PB1 y PB2, y sugieren la formación

de dímeros PB1-PA y PB1-PB2 y su transporte conjunto al núcleo (Momose et al., 2002; Naito et al., 2007b).

A pesar de que las tres subunidades son necesarias para que el complejo sea activo tanto en replicación como en transcripción, se han asignado funciones específicas a cada una de las subunidades.

### 1.5.2.- La subunidad PB1

PB1 es la mayor de las dos proteínas básicas del complejo y es la polimerasa propiamente dicha (Braam et al., 1983; Ulmanen et al., 1981). Actúa como núcleo del complejo, interaccionando de manera independiente con PB2 y PA (Biswas and Nayak, 1996; Digard et al., 1989) y uniendo también NP (Biswas et al., 1998; Medcalf et al., 1999). PB1 es la subunidad mas conservada evolutivamente y presenta homología de secuencia con otras DNA y RNA polimerasas y contiene cuatro motivos proteicos conservados en las RNA polimerasas dependientes de RNA (Kobayashi et al., 1996; Muller et al., 1994; Poch et al., 1989). Mutagénesis de estas regiones en PB1 confirmaron que son necesarias para la actividad transcripcional (Biswas and Nayak, 1994; Li et al., 2001; Mahy, 1983). Ensayos de *cross-linking* de RNPs con sustratos marcados radiactivamente, mostraron que sólo PB1 resultaba marcada (Asano and Ishihama, 1997; Asano et al., 1995; Kolpashchikov et al., 2004; Romanos and Hay, 1984), sugiriendo que el sitio de unión al sustrato estaba localizado en esta subunidad. En conjunto, todos estos datos aportan fuertes evidencias de que PB1 es efectivamente responsable de la adición de nucleótidos durante la síntesis del RNA.

Como ya se ha mencionado anteriormente,



la polimerasa se une a los promotores constituidos por los extremos conservados de cada segmento de vRNA y cRNA de manera específica de secuencia (Fodor et al., 1994; González and Ortín, 1999a, b; Li et al., 1998; Tiley et al., 1994) y los sitios de unión para los extremos 5' y 3' de las vRNPs y también de las cRNPs se encuentran en PB1 (González and Ortín, 1999a, b; Li et al., 1998).

### 1.5.3.- La subunidad PB2

La subunidad PB2 tiene un papel fundamental en la transcripción del mRNA, ya que es capaz de unir las estructuras cap metiladas en su extremo 5' de los pre-mRNAs de la célula hospedadora, para que sean posteriormente cortadas y utilizadas como *primers* para la síntesis de los mRNAs virales (Blaas et al., 1982a, b; Braam et al., 1983; Shi et al., 1996; Ulmanen et al., 1981).

PB2 comparte una cierta homología de secuencia con proteínas celulares que reconocen y unen estructuras cap (de la Luna et al., 1989; Honda et al., 1999; Li et al., 2001) y mediante ensayos de *cross-linking* y mutagénesis se han descrito varias regiones de PB2 implicadas en el reconocimiento de dichas estructuras (Blaas et al., 1982a, b; Braam et al., 1983; Fechter et al., 2003; Honda et al., 1999; Li et al., 2001; Penn et al., 1982; Ulmanen et al., 1981). También se han descrito algunos mutantes termosensibles (ts) de PB2 que presentan defectos en el reconocimiento del cap *in vitro* (Ulmanen et al., 1983). Sin embargo, debido a la heterogeneidad de sitios propuestos, estos resultados han sido motivos de controversia. Recientemente se ha resuelto la estructura del dominio responsable del reconocimiento y unión de

cap por rayos X y se ha determinado por ensayos de mutagénesis que los residuos 323 hasta 483 están implicados en dicho reconocimiento (Guilligay et al., 2008).

Además de estar implicada en transcripción, PB2 tiene un papel en la replicación viral dado que mutantes puntuales en esta proteína producen defectos en la replicación pero no en la transcripción viral (Gastaminza et al., 2003). Al igual que con PB1, mediante ensayos de *cross-linking* se ha determinado que PB2 es capaz de unir el RNA genómico, aunque se desconoce cual es la región de la proteína responsable del reconocimiento (Fodor et al., 1993).

### 1.5.4.- La subunidad PA

La subunidad PA es la peor caracterizada de las proteínas del complejo en cuanto a función, pero se la ha implicado en la formación de complejos funcionales de la polimerasa (Kawaguchi et al., 2005) y se ha descrito que su presencia en el complejo de la polimerasa es esencial tanto para los procesos de transcripción como de replicación (Hara et al., 2006; Huang et al., 1990; Mahy, 1983; Perales and Ortín, 1997). Pese a esto no se le ha podido atribuir un papel concreto ni en replicación ni en transcripción, aunque el fenotipo de algunos virus mutantes termosensibles (ts) en el segmento que codifica PA sugirieron la implicación de dicha proteína en la replicación del vRNA y el cRNA (Gubareva et al., 1991; Krug et al., 1975; Mahy, 1983; Mowshowitz, 1981; Thierry and Danos, 1982). No obstante, trabajos recientes indican la importancia de PA tanto en replicación como en transcripción (Fodor et al., 2002), e incluso en la elongación del RNA (Fodor et al., 2003). También

se han descrito varias mutaciones que afectan específicamente a la actividad endonucleotídica de la polimerasa sin afectar el reconocimiento de la estructura 5' cap ni la síntesis replicativa (Fodor et al., 2002), lo que sugiere que esta subunidad también participa en la iniciación de la transcripción. De acuerdo con estos datos, dos trabajos muy recientes han revelado mediante estudios estructurales y bioquímicos que el dominio N-terminal de PA tiene actividad nucleasa y que su estructura es muy parecida a las nucleasas de tipo II (Dias et al., 2009; Yuan et al., 2009). Por tanto, junto con los resultados de Hara y colaboradores se ha propuesto que la subunidad responsable del corte endonucleotídico es PA y no PB1 como se había descrito anteriormente mediante ensayos de *cross-linking* (Li et al., 1998). También se ha descrito la implicación de PA en la formación de partículas virales dado que virus con mutaciones en los residuos 507-508 de esta subunidad son capaces de sintetizar correctamente los tres tipos de RNAs mientras que la producción de virus está totalmente anulada (Regan et al., 2006).

En el laboratorio mostramos que PA se fosforila *in vivo* en residuos de serina y treonina (Sanz-Ezquerro et al., 1998) y se cree que la kinasa que lleva a cabo su fosforilación es la caseína kinasa II (Sanz-Ezquerro et al., 1998). A lo largo de la secuencia aminoacídica de PA existen múltiples sitios potenciales de fosforilación por esta kinasa y al menos uno de ellos, T157, parece importante puesto que su mutación reduce el estado de fosforilación de la proteína (Perales et al., 2000). No obstante, está por aclarar la relevancia de esta fosforilación para la función biológica

de la proteína.

La función mejor caracterizada de PA es su actividad proteasa. PA presenta una actividad inductora de proteólisis *in vivo*, que mediante el análisis de mutantes de delección se ha visto que reside en el tercio N-terminal de la proteína (Sanz-Ezquerro et al., 1996), mientras que posee una actividad serín proteasa detectada *in vitro* localizada en la serina 624 (Hara et al., 2001). En cuanto a la relevancia biológica de la actividad serín proteasa de PA, ensayos de mutagénesis del residuo 624 no mostraron ningún defecto en transcripción ni en replicación (Fodor et al., 2002) y un virus con la mutación S624A en PA no tenía afectado su crecimiento (Toyoda et al., 2003), por lo que esta actividad serín proteasa no parece vital para el desarrollo del ciclo de infección del virus. Los estudios en nuestro laboratorio centrados en la actividad proteolítica de PA inducida por su región N-terminal (Sanz-Ezquerro et al., 1996) mostraron que dicha actividad era relevante para la replicación llevada a cabo por la polimerasa, en concreto los residuos T157 y T162 resultaron ser importantes para la replicación (Huarte et al., 2003; Perales et al., 2000), aunque esto podía deberse a un requerimiento del residuo T157 y no a la actividad proteolítica, ya que se han identificado otros dos mutantes puntuales que presentan cierta disminución en la proteólisis pero, a diferencia del T157 que presenta una disminución importante de la actividad proteolítica, no mostraron efecto en la expresión de un gen marcador con características similares a los genes de gripe (Naffakh et al., 2001). Esto podría explicarse por la menor actividad proteolítica del mutante T157 y también



por la importancia que pudiera tener la fosforilación de este residuo de PA, ya que se había mostrado que la mutación en T157 producía un descenso general del estado de fosforilación de PA (Perales et al., 2000).

Teniendo en cuenta todos estos resultados, parece probable que las actividades proteolíticas centradas en el residuo 624 y en la región N-terminal sean diferentes. La actividad serín proteasa no parece tener importancia en la replicación del RNA ni en el crecimiento del virus, mientras que el residuo T157, necesario para la actividad proteolítica inducida por el tercio N-terminal de PA, parece relevante. No obstante, queda por demostrar si esta importancia está ligada a la actividad proteasa, a la fosforilación o a alguna función todavía no descrita de PA.

### 1.5.5.- La nucleoproteína

El cuarto componente proteico de las RNPs necesario para la síntesis del RNA es la nucleoproteína o NP, una proteína que está bastante conservada evolutivamente entre las distintas cepas virales. La NP está fosforilada, predominantemente en la serina en posición 3, que está conservada en todas las cepas del tipo A (Arrese and Portela, 1996). Es una proteína muy básica que une RNA de cadena sencilla de manera cooperativa e independiente de secuencia (Baudin et al., 1994; Kingsbury et al., 1987; Scholtissek and Becht, 1971; Yamanaka et al., 1990). A pesar de que la región imprescindible para la unión a RNA se mapeó en el tercio C-terminal de la proteína (Albo et al., 1995; Kobayashi et al., 1994), esta unión es de baja afinidad y se ha mostrado que aminoácidos repartidos por toda su secuencia son importantes

para que esta unión sea óptima (Elton et al., 1999). La interacción de NP con el RNA es de una molécula de NP por entre 24 y 25 nucleótidos (Compans et al., 1972; Ortega et al., 2000), y es una unión que no protege al RNA de la degradación por RNAsas (Baudin et al., 1994; Duesberg, 1969), ya que la NP se une al esqueleto de azúcar-fosfato del RNA dejando las bases nitrogenadas expuestas (Baudin et al., 1994).

La proteína NP es capaz de oligomerizar consigo misma (Elton, 2005; Ruigrok and Baudin, 1995) y también interacciona con PB1 y PB2 dentro de las RNPs (Biswas et al., 1998; Medcalf et al., 1999; Poole et al., 2004) y con la proteína M1. La interacción de M1 con NP tiene importancia en el control de la transcripción llevada a cabo por las RNPs (Perez and Donis, 1998; Zvonarjev and Ghendon, 1980), y en su tráfico intracelular. NP es capaz de interactuar con receptores de importación nuclear (O'Neill et al., 1995) a través de sus señales NLS, con la exportina I (CRM1) a través de la señal de exportación nuclear (NES) (Neumann et al., 1997) y con elementos del citoesqueleto celular para llevar a cabo el tráfico de las RNPs (Avalos et al., 1997; Digard et al., 1999; Momose et al., 2007; Simpson-Holley, 2002 #239).

La proteína NP desempeña un papel esencial en la organización estructural de las RNPs y es necesaria para la transcripción y replicación del genoma viral, ya que la polimerasa no es capaz de utilizar un RNA desnudo como molde (Honda et al., 1988). Además, se ha implicado a la proteína NP como un posible regulador del cambio de actividad de la polimerasa de transcriptasa a replicasa del genoma viral.

## 2.- EL CICLO DE INFECCIÓN DEL VIRUS DE LA GRIPE

El virus de la gripe, al igual que el resto de virus es un parásito intracelular obligado, por lo que necesita desarrollarse dentro de la célula a la que infecta. Allí, gracias a distintas estrategias consigue manipular muchos de los procesos celulares en su propio beneficio y desarrollar de esa forma su ciclo vital. El ciclo de infección del virus de la gripe presenta una duración de unas 8h y está muy bien regulado tanto a nivel temporal como espacial. Así, se pueden distinguir una serie de etapas como: la entrada del virus; la expresión génica, que incluye los procesos de transcripción viral así como la maduración de los transcritos y su traducción; la replicación del RNA viral y por último la formación y liberación de las nuevas partículas virales.

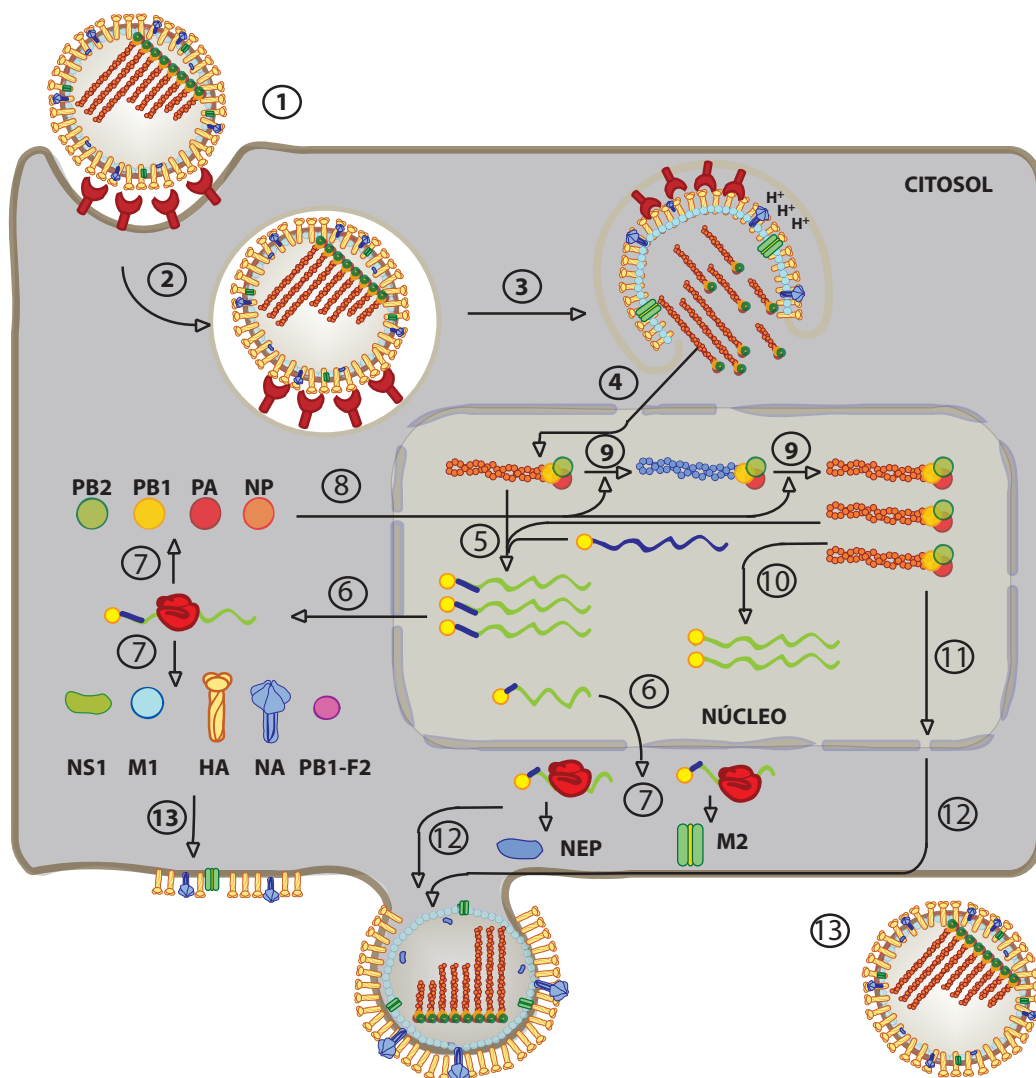
### 2.1.- Adsorción y entrada de las partículas virales

La infección comienza con la interacción del virus con la célula diana (**Figura 7, paso 1**). Este hecho suele ocurrir en las células epiteliales de tracto respiratorio superior e inferior de vertebrados por medio del ácido siálico presente en glicoproteínas y glicolípidos que constituye el receptor del virus (Weis et al., 1988). Son las moléculas de HA presentes en la envuelta del virión las responsables de la interacción. Aunque la afinidad de la HA por su receptor es baja, las múltiples interacciones de baja afinidad son las responsables de la alta avidez que presenta el virus por la superficie celular y que permite su entrada en la célula. La entrada resulta ser por un mecanismo de endocitosis mediada por

receptor (Fazekas De St Groth, 1948), en el que el contacto del virus con su receptor provoca una invaginación de la membrana y la internalización de las partículas virales en unas vesículas revestidas de clatrina (**Figura 7, paso 2**). La clatrina desaparece al producirse la unión del lisosoma formándose los endolisosomas. El pH interno de dichas vesículas se va acidificando progresivamente y, gracias al canal iónico que forma la proteína M2, el interior del virión también sufre esa acidificación (Helenius, 1992; Pinto et al., 1992). Este hecho produce una desestabilización de la interacción entre las RNPs y la proteína M1. Además, el pH ácido provoca un cambio conformacional en la HA (Stegmann et al., 1987a; Stegmann et al., 1987b) favoreciendo la fusión de la envuelta del virión y la membrana endolisosomal. Todos estos eventos permiten que las RNPs se liberen al citoplasma (**Figura 7, paso 3**) y se dirijan rápidamente al núcleo de la célula (Wang et al., 1997) (**Figura 7, paso 4**) donde tendrán lugar los procesos de transcripción y replicación del genoma viral (**Figura 7, pasos 5, 9 y 10**).

### 2.2.- Transcripción y replicación del RNA viral

Una vez que las RNPs han atravesado la membrana nuclear y se encuentran en el núcleo comienzan los procesos de transcripción y replicación del RNA viral. Ambos son llevados a cabo por la polimerasa viral, siempre en el contexto de la RNP (revisado en (Elton, 2005)). La síntesis de los mRNAs virales requiere que la maquinaria de transcripción celular dirigida por la RNAP II esté funcionando de manera activa (Lamb and Choppin,



**Figura 7. Esquema del ciclo viral del virus de la gripe.**

Se muestran todos los pasos de la infección ordenados numéricamente. 1. Adsorción. 2. Fusión de membranas. 3. Desencapsidación. 4. Transporte de las vRNPs al núcleo. 5. Transcripción primaria. 6. Transporte de mRNAs al citoplasma. 7. Traducción. 8. Transporte de proteínas virales al núcleo. 9. Replicación del RNA viral. 10. Transcripción secundaria. 11. Transporte de las vRNPs progenie al citoplasma. 12. Transporte de las vRNPs progenie hacia la membrana celular. 13. Encapsidación, formación y liberación de viriones progenie.

1977; Spooner and Barry, 1977). Esto se debe a que la polimerasa viral utiliza oliconucleótidos con estructuras cap tipo I de los pre-mRNAs celulares que están siendo sintetizados activamente, como *primers* para la síntesis de sus propios mensajeros (Plotch et al., 1979; Plotch et al., 1981). Además de esta dependencia funcional, en estos últimos años también se

ha descrito una dependencia estructural, ya que la polimerasa viral se ha encontrado asociada de manera específica al complejo de la RNAP II (Engelhardt et al., 2005). Una vez que se ha acumulado una cantidad suficiente de NP soluble en el núcleo, comienza la replicación del RNA viral (Shapiro and Krug, 1988). Para ello la polimerasa viral copia el molde vRNA

generando moléculas de cRNA que son encapsidadas por monómeros de NP formando las cRNPs. Estas cRNPs sirven como intermediarios replicativos para la síntesis de nuevas vRNPs progenie que pueden servir de molde para nuevas rondas de transcripción secundaria (**Figura 7, paso 10**), y eventualmente son encapsidadas en los viriones progenie (**Figura 7, pasos 11, 12 y 13**).

A pesar de que todavía no se comprende completamente, los procesos de transcripción y replicación viral están mecanísticamente bien diferenciados, ya que son capaces de dar lugar a productos diferentes, llevándose ambos a cabo por la polimerasa viral y a partir del mismo molde de vRNA.

### 2.2.1.- La transcripción

Para que tenga lugar la iniciación de la transcripción o síntesis de mRNA, es necesario que la polimerasa esté uniendo ambos extremos del vRNA molde. En este proceso se utilizan como *primers* fragmentos de RNA con estructura 5' cap derivados del corte endonucleolítico de los pre-mRNAs producidos por la RNAP II. Por este motivo, la transcripción viral requiere de una transcripción celular activa, y drogas que inhiben la RNAP II, como la  $\alpha$ -amanitina o la actinomicina D (Rott and Scholtissek, 1970) inhiben también la transcripción viral.

Aunque no parece esencial, el sitio de iniciación de la síntesis sobre el molde de vRNA está influenciado por interacciones entre el *primer* y el molde (Krug et al., 1980). Normalmente la transcripción se inicia con la adición de un residuo G al extremo 3' del *primer*, dirigido por el último residuo C en el molde (Plotch et al., 1981). El inicio de la

transcripción requiere ATP, probablemente para que la polimerasa pueda realizar la transición entre la iniciación y la elongación de la transcripción (Klump et al., 1998).

La elongación de los transcritos de mRNA continúa hasta que la polimerasa alcanza una secuencia corta, de entre 5 y 7 residuos de U situada a unos 15 nucleótidos del extremo del vRNA. La polimerasa copia reiteradamente esta secuencia, generándose una cola de poli A (Poon et al., 2000; Poon et al., 1999).

### 2.2.2.- La replicación

El primer paso de la replicación consiste en la síntesis de moléculas de cRNA, que son copias completas y complementarias al vRNA. La replicación se da en ausencia de *primer*, y además la síntesis no se detiene en la secuencia de uridinas, sino que continúa hasta el final del molde de vRNA, mediante un evento denominado *antiterminación* (Hay et al., 1982). Por lo tanto, deben de ocurrir cambios en la polimerasa para que ésta cambie de actividad transcriptiva a replicativa, pero estos todavía no se conocen.

El cambio de transcripción a replicación requiere de la síntesis de proteínas virales (Barrett et al., 1979; Hay et al., 1977), en concreto se ha estudiado en detalle el requerimiento de moléculas de NP libre para que ocurra esta transición (Beaton and Krug, 1986; Krug et al., 1975; Medcalf et al., 1999; Scholtissek and Bowles, 1975; Shapiro and Krug, 1988), aunque la presencia de la proteína NP no parece ser suficiente para esta regulación. No se descarta la implicación de la proteína PA en la regulación de la transición de una polimerasa activa en transcripción a activa en replicación, y también existe la

posibilidad de que factores celulares que interaccionan con las RNPs desempeñen un papel importante en este proceso.

Se han identificado factores celulares que interaccionan con la polimerasa viral y/o las RNPs y que podrían estar modulando su actividad transcripcional o replicativa (Honda et al., 2007; Huarte et al., 2001; Jorba et al., 2008b; Kawaguchi and Nagata, 2007; Mayer et al., 2007; Momose et al., 2001; Momose et al., 1996; Momose et al., 2002; Naito et al., 2007a; O'Neill et al., 1995; Shimizu et al., 1994) y nos centraremos en ellos mas adelante.

### 2.3.- Procesamiento de los RNAs y síntesis de proteínas virales

Los productos de transcripción colineales al vRNA de los segmentos M y NS codifican las proteínas M1 y NS1 respectivamente. Estos transcritos pueden sufrir *splicing* (Inglis et al., 1979; Inglis and Brown, 1981; Lamb and Choppin, 1983; Lamb and Lai, 1980; Lamb et al., 1981) para dar lugar a los mRNAs que codifican las proteínas M2 y NEP. Es la maquinaria de *splicing* de la célula hospedadora la que elimina los intrones correspondientes en estos segmentos. En el segmento M existe un segundo sitio de *splicing* que genera el mRNA3, con una escasa capacidad codificante de sólo 9 aminoácidos, y cuyo producto de traducción no ha sido identificado por el momento.

El proceso de *splicing* se encuentra regulado de manera que la relación de acumulación de los mRNAs NS1/NEP y M1/M2 varía a lo largo de la infección, (revisado en (Palese, 2006)). Se ha visto que la proteína NS1 interviene como reguladora en el *splicing* de los transcritos virales (Garaigorta and Ortin, 2007;

Valcárcel et al., 1991).

Los mRNAs virales son transportados al citosol de la célula infectada (**Figura 7, pasos 6 y 7**) donde son traducidos para dar lugar a las proteínas del virus. Se ha descrito que los mRNAs virales se transportan de manera muy rápida y eficaz a través de la membrana nuclear (Shapiro et al., 1987). Se desconoce hasta el momento cual o cuales son las vías de exportación que siguen los mRNAs virales aunque se ha propuesto la implicación de la vía celular TAP/p15 con la participación de la proteína NS1 (Wang et al., 2008). Además, se ha relacionado su transporte con la asociación a la maquinaria transcripcional celular (Amorim et al., 2007). La traducción la lleva a cabo la maquinaria celular, pero el virus toma el control traduccional estimulando la traducción de los mRNAs virales e inhibiendo la expresión de los mRNAs celulares, en un proceso conocido como *shut off* (Garfinkel and Katze, 1992; Katze and Krug, 1990; Krug, 1989). Se ha propuesto que en esta estimulación traduccional intervenga la proteína NS1, ya que se sabe que se une a la región 5' no codificante de los mRNAs virales (de la Luna et al., 1995) e interacciona con los factores de traducción eIF4G (Aragón et al., 2000) y PABP1 (Burgui et al., 2003). Además, se ha descrito que la traducción de los mRNAs virales parece que ocurre independientemente del factor celular de unión a cap, eIF4E (Burgui et al., 2007).

### 2.4.- Transporte de las RNPs al citoplasma. Formación y liberación de nuevas partículas virales

Una vez que se han acumulado una gran cantidad de vRNPs progenie en el núcleo de la célula, éstas son exportadas

al citoplasma y transportadas a la membrana plasmática donde tendrá lugar su empaquetamiento para formar parte de la progenie viral (**Figura 7, pasos 11, 12 y 13**). Este fenómeno ocurre en las etapas tardías de la infección (5 o 6 hpi). Las proteínas NEP y M1 desempeñan una función clave en la salida de las RNPs al citoplasma. Por una parte, la proteína NEP junto con la NP presente en las RNPs, interacciona con proteínas del poro nuclear siguiendo la vía de CRM-1 (Elton et al., 2001; O'Neill et al., 1998); por otra parte, M1 hace de puente de unión entre la RNP y la proteína NEP (Martin and Helenius, 1991).

Cuando las RNPs han abandonado el núcleo y se encuentran en el citoplasma son transportadas hacia la membrana celular a través de los microfilamentos de actina (Avalos et al., 1997). Allí, en regiones concretas ricas en colesterol denominadas *lipid rafts*, se encuentran las glicoproteínas virales HA y NA (Nayak et al., 2004; Scheiffele et al., 1999; Simpson-Holley et al., 2002). La encapsidación de las RNPs parece ser dirigida por la proteína M1 (Gómez-Puertas et al., 1999). Trabajos recientes involucran al tallo citoplasmático de M2 en dicha función, ya que su interacción con M1 tiene lugar a dicho nivel (Iwatsuki-Horimoto et al., 2006; McCown and Pekosz, 2006). La liberación de las partículas se da mediante un proceso de *budding* o gemación y finaliza con la acción catalítica de la NA que degrada el ácido siálico presente en la membrana celular y en las proteínas de la envuelta viral, permitiendo la dispersión de los virus y evitando su agregación en la membrana celular (Palese et al., 1974). El empaquetamiento del genoma

viral requiere de la incorporación de 8 RNPs distintas; sólo así se consiguen viriones infectivos. Numerosas evidencias permiten la aceptación de un modelo de empaquetamiento dirigido que propone la existencia de un proceso de selección de las 8 RNPs que se encapsidan. Por una parte, la cantidad de cada vRNP en los viriones es equimolar aunque su acumulación en las células infectadas pueda variar (Smith and Hay, 1982). Además, vRNAs defectivos interferentes compiten de manera muy específica con la incorporación de su vRNA homólogo y no así en el de otros vRNAs (Duhaut and McCauley, 1996; Nayak et al., 1982). Más recientemente, varios trabajos han descrito secuencias en *cis* presentes en las regiones codificantes y no codificantes en los extremos 5' y 3' de todos los genes para un correcto empaquetamiento de las RNPs (Fujii et al., 2005; Fujii et al., 2003; Liang et al., 2005; Liang et al., 2008; Muramoto et al., 2006; Noton et al., 2007; Ozawa et al., 2009; Watanabe et al., 2003). Otro resultado que apoya una incorporación selectiva de las 8 RNPs es el publicado por Noda y colaboradores, en el que mediante cortes seriados de viriones y técnicas de tomografía, observan una distribución constante de las RNPs en forma de anillo, en el que 7 de ellas se encuentran alrededor de una RNP central (Noda et al., 2006). Todos estos resultados indican que el mecanismo de empaquetamiento de las 8 RNPs vendría dado por señales en *cis* presentes no sólo en las regiones no codificantes de los vRNAs sino también en las zonas 3' y 5' adyacentes a ellas y que forman parte de las zonas codificantes. Pero además de estas señales en *cis* es posible que factores en *trans* también



estén implicados en este mecanismo, ya que un mutante en la subunidad PA de la polimerasa viral presenta defectos en la formación de partículas virales (Regan et al., 2006).

### 3.- FACTORES CELULARES ASOCIADOS A COMPONENTES DEL VIRUS DE LA GRIPE

Los virus son parásitos intracelulares obligados debido a que la información genética que contienen en su genoma es limitada y por tanto establecen interacciones con la maquinaria de la célula hospedadora para completar su ciclo vital. El virus de la gripe lleva a cabo numerosos procesos dentro de la célula infectada que implican poner a su servicio la maquinaria celular, y todo esto lo realiza de manera rápida y eficaz, gracias a lo cual puede propagarse mediante sucesivos ciclos de infección y competir con la resistencia que ofrece el individuo infectado. Para todo ello, necesita establecer interacciones con muchos factores celulares, de muy distinta naturaleza y función, de los cuales todavía se sabe muy poco. Los primeros estudios que buscaron proteínas celulares que interaccionaran con las del virus de la gripe utilizaron técnicas de doble híbrido en levaduras o coimmunoprecipitaciones con anticuerpos específicos dirigidos contra un factor celular que se pensaba que podía interaccionar (Digard et al., 1999; Engelhardt et al., 2005; Huarte et al., 2001; Momose et al., 2002; Wang et al., 1997). Recientemente se han empleado abordajes de tipo proteómico para identificar factores celulares asociados a las RNPs o a la polimerasa viral (Jorba

et al., 2008b; Mayer et al., 2007). En la **Tabla II** se resumen los factores celulares identificados asociados a componentes virales que están implicadas en las distintas etapas del ciclo viral (Josset et al., 2008), y a continuación se los describe más detalladamente.

#### 3.1.- Factores implicados en el tráfico intracelular de componentes virales

Algunas proteínas que se ha descrito que interaccionan con componentes del virus tienen funciones relacionadas con la importación y exportación de factores al núcleo. Muchas de ellas son *shuttling proteins*, es decir, proteínas que tienen señales de localización nuclear (NLS) y de exportación nuclear (NES) en su secuencia, y cuya interacción con las proteínas del virus podría intervenir en el tráfico de componentes virales a lo largo de la infección. Se han identificado la importina  $\alpha 1$  (NPI-1) (O'Neill et al., 1995) y la importina  $\alpha 2$  (NPI-3) (Wang et al., 1997), que interaccionan con NP, y que participan en el transporte al núcleo de las RNPs. También se ha descrito la interacción de PB2 con la importina  $\alpha 5$  y se ha obtenido un co-cristal de esta importina con un dominio C-terminal de PB2 (Tarendeau et al., 2007).

Para la localización nuclear de las subunidades y para la correcta formación del complejo de la polimerasa viral se ha propuesto la implicación de dos factores celulares alternativos: 1) Heat shock proteins 90 (Hsp90), que interacciona con PB2 y tras la infección se relocaliza en el núcleo junto con esta subunidad (Momose et al., 2002) fue propuesta por Naito y colaboradores como un factor implicado en la formación del complejo de la polimerasa

Virus	Célula	Función biológica
<b>Interacción con proteínas transcripcionales</b>		
NS1	CPSF	Corte y poliadenilación de pre-mRNAs
NS1	PABP-II	Elongación de colas de poliA
PA	hCLE	Modulador de la transcripción celular
RpRd	CTD de RNA pol II	Dominio implicado en el reclutamiento de factores necesarios para la transcripción
vRNP	TIF1-beta	Factor de regulación de la transcripción asociado a heterocromatina
<b>RpRd/vRNP</b>	<b>hnRNP M</b>	Se asocia a transcritos de la RNA pol II durante la iniciación
RpRd	<b>NXP2</b>	Proteína de matrix nuclear implicada en la represión de la transcripción
vRNP	ILF3	Regulador de la transcripción génica
<b>PB2</b>	<b>hnRNP U</b>	Proteína de unión a pre-mRNA
<b>Interacción con proteínas de la maquinaria de <i>splicing</i></b>		
NPs/RpRd	BAT1/UAP56	Factor de <i>splicing</i>
NS1	NS1-BP	Podría estar implicada en el <i>splicing</i> de pre-mRNAs
NS1	snRNP U6	Componente ribonucleico del <i>spliceosome</i>
vRNP	hnRNP A1	Factor del <i>spliceosome</i>
vRNP/RdRp	<b>hnRNP M</b>	Factor del <i>spliceosome</i>
<b>RpRd</b>	<b>hnRNP H1</b>	Factor del <i>spliceosome</i>
vRNP	ILF3	Regulador de la transcripción génica
vRNP	SFR3	Factor de <i>splicing</i>
<b>RpRd</b>	<b>DDX5</b>	Factor implicado en el ensamblaje del <i>spliceosome</i>
<b>RpRd</b>	<b>SFPQ/PSF</b>	Factor implicado en el ensamblaje del <i>spliceosome</i> asociado al CTD de RNA pol II
<b>RpRd</b>	<b>CoAA</b>	Coactivador de la transcripción regulada por esteroides y del <i>splicing</i> alternativo
<b>Interacción con cromatina y otras proteínas nucleares</b>		
M1	Histonas	Proteínas constitutivas del nucleosoma
NP	Histonas	Proteínas constitutivas del nucleosoma
PA	MCM	DNA helicasa implicada en replicación de plásmidos y en la progresión del ciclo celular
vRNP	RNA helicasa II	Helicasa dependiente de ATP
vRNP	DDB1	Proteína de unión a DNA asociada al complejo centromérico
vRNP	Hsc70	Proteína nuclear de respuesta al estrés celular
vRNP	PARP1	chromatin-associated enzyme poly(ADP-ribose) polymerase
PA	CHD6	Remodelador de cromatina
NS1/NEP/M1	PML/ND10*	Implicados en respuesta celular antiviral
<b>Interacción con proteínas de la maquinaria de transporte celular</b>		
NP	CRM1	Factor de exportación nuclear
NP	KPNA1/2	Factor de importación nuclear
NS1	TAP/p15	Factores de la vía de exportación de RNA
<b>NS1</b>	<b>KPNA1/2/3/4/5/6</b>	Factores de importación nuclear
NS2	Rab/hRIP1-yRIP1	Nucleoporinas



Virus	Célula	Función biológica
<b>Interacción con proteínas de la maquinaria de transporte celular</b>		
PB1	RanBP5	Factor de importación nuclear
vRNP	KPNA1	Factor de importación nuclear
<b>PB2</b>	<b>KPNA1/2/6</b>	Factor de importación nuclear
vRNPs/NS1	PABP1	Proteína de transporte núcleo-citoplasma implicado en exportación de mRNAs
RpRd	DDX3	Proteína de transporte núcleo-citoplasma asociada a CRM1. helicasa DEAD-Box
NP	Actina	Componente de los filamentos de actina
<b>RpRd/vRNP</b>	<b>beta-tubulina</b>	Componente de los microtúbulos
virus/NS1	NXF1	Factor de exportación nuclear de mRNAs que contienen uniones exón-exón
<b>Interacción con proteínas de la maquinaria de traducción celular</b>		
RpRd	eIF4G	Componente del complejo de iniciación de la traducción del eIF4F
vRNP	L9/S5/L7/L5/P0	Componentes de las subunidades 40S y 60S del ribosoma
<b>RpRd</b>	<b>S3</b>	Componente de la subunidad 40S del ribosoma
<b>Interacción con proteínas nucleolares</b>		
NS1/vRNPs	Nucleolina	Proteína multifuncional del nucleolo
vRNP	B23	Chaperona multifuncional del nucleolo
<b>Interacción con proteínas mitocondriales</b>		
PB1-F2	ANT3	Proteína mitocondrial
<b>PB1-F2</b>	<b>VDAC1</b>	Proteína mitocondrial
virus	COXA1	Subunidad del citocromo c oxidasa (COX)
<b>Interacción con proteínas con otras funciones</b>		
NS1/RpRd	hStaufen	Proteína de unión a RNA implicada en la localización de mRNAs durante el desarrollo
NPs	Tat-SF1	Factor de transcripción presente en complejos de elongación
NP/PB2	Mx	Proteína antiviral de respuesta a interferón
PB1	Ebp1	Proteína nuclear multifuncional implicada en crecimiento celular
PB2	Hsp90	Proteína <i>house-keeping</i> multifuncional
vRNA	GRSF1	Regulador positivo de la traducción
vRNA	La	Autoantígeno LA
virus	ATP6V0D1	Factor de la vía de endocitosis implicada en la fusión de compartimentos intracelulares por acidificación
NS1	PKR	Respuesta antiviral (bloqueo traduccional y apoptosis)
<b>NS1</b>	<b>p85beta</b>	Subunidad reguladora de PI3K
NS1	CRK/CRKL Src	Señalización celular
M1	VPS28	Componente del complejo ESCRT-1
M1	Cdc42	Miembro de la familia Rho de unión a GTP
<b>PB2</b>	<b>MPO</b>	Hemoproteína
<b>PB2</b>	<b>CSN1</b>	Fosfoproteína, miembro de la familia de Cns

**Tabla II. Proteínas celulares identificadas que interaccionan con proteínas del virus de la gripe.**

Las interacciones fueron caracterizadas por estudios bioquímicos y/o proteómicos. Tomado de L. Josset y colaboradores, 2008.

(Naito et al., 2007b), 2) la importina- $\beta$ 3 (RanBP5), que interacciona con PB1 o con el dímero PB1-PA (Deng et al., 2006), y que interviene en su localización nuclear en los primeros estadios de la infección. También se han descrito interacciones de la RNP viral con estructuras de la periferia nuclear y componentes de la vía de exporte de CRM1, como la propia CRM1, importina- $\alpha$ , fibras de actina y proteínas Mx (Digard et al., 1999; Elton et al., 2001; Engelhardt et al., 2004; Ma et al., 2001), éstas últimas probablemente a través de NP (Kochs and Haller, 1999a, b; Turan et al., 2004; Weber et al., 2000). Por otra parte, se ha descrito que la chaperona Hsp70 interacciona con las RNPs virales a través de NP y es capaz de inhibir la salida de las vRNPs al citosol a temperaturas elevadas, debido a que es capaz de disociar la unión entre las vRNPs y M1 (Hirayama et al., 2004). Por su parte, la proteína Hsc70 se asocia a M1 y a 41°C inhibe la exportación de las vRNPs (Watanabe et al., 2006).

Los mRNAs virales deben ser exportados al citosol para su traducción. Se ha observado que la salida de los mRNAs virales no es sensible a la droga leptomomicina B, y es por tanto, un proceso independiente de la vía CRM1. Sin embargo, la proteína NS1 interacciona con los elementos TAP/p15 y ambas copurifican con los mRNAs virales (Wang et al., 2008). Por tanto, se cree que los mensajeros virales se exportan por la vía TAP/p15 con la participación de NS1 y la RNAP II (Amorim et al., 2007). Además, NS1 interacciona con el complejo de exportación nuclear de mRNAs celulares (NFX1/TAP, p15/NXT, Rae/mnrp41 y E1B-AP5), formando un complejo inhibitorio que podría estar implicado en la retención nuclear de los mRNAs celulares durante la

infección (Satterly et al., 2007).

Recientemente, Jorba y colaboradores han identificado mediante técnicas de proteómica la interacción entre la polimerasa viral y la RNA helicasa DDX3 (Jorba et al., 2008b), que está implicada en la vía de exportación de CRM1 (Yedavalli et al., 2004), y se piensa que estos factores pueden participar en la salida de los mRNAs virales al citoplasma para su traducción.

Los componentes que forman parte del virus necesitan dirigirse a diferentes localizaciones celulares a lo largo de la infección. Varios estudios han documentado interacciones de proteínas virales con componentes del citoesqueleto celular, y se piensa que estas interacciones pueden facilitar el transporte de proteínas y RNPs en distintos momentos del ciclo viral. Así, se ha descrito la interacción entre NP y filamentos de F-actina (Digard et al., 1999), que participan en el tráfico de RNPs en el citosol. También se ha descrito la interacción entre la  $\beta$ -tubulina y la polimerasa viral (Jorba et al., 2008b), así como con la proteína PB1-F2 (Zamarin et al., 2005), pero por el momento no está claro en qué momento del ciclo de infección están implicadas.

### 3.2.- Factores que forman parte de estructuras nucleares

Estudios provenientes de diferentes grupos han descrito interacciones de proteínas virales con estructuras nucleares, como los nucleolos, los *speckles* o los PMLs. Así, se ha visto que las proteínas M1, NS1 y NEP interaccionan con ND10/PMLs (Sato et al., 2003), y se cree que esta interacción está relacionada con la alteración de la respuesta celular antiviral. NS1

interacciona con NS1-BP, que se localiza junto con SC-35 en *speckles* en respuesta a la infección (Wolff et al., 1998), al igual que otros componentes del *spliceosome*. Recientemente se ha descrito la interacción de las RNPs con las proteínas NPM (*nucleophosmin*) y nucleolina (Mayer et al., 2007). NPM es una proteína de tipo *shuttling*, aunque con localización nucleolar, y con actividad chaperona, y se ha observado que, en presencia del virus, se relocaliza del nucleolo al nucleoplasma y estimula la actividad de la polimerasa viral. La nucleolina también se ha encontrada asociada a NS1 (Murayama et al., 2007). Las vRNPs y M1 interactúan con nucleosomas (García-Robles et al., 2005; Takizawa et al., 2006; Zhirnov and Klenk, 1997), lo que está de acuerdo con trabajos previos que sugerían que las RNPs en la célula infectada están asociadas fuertemente a la cromatina (Bui et al., 2000; Bukrinskaya et al., 1979), y que la síntesis del RNA viral ocurre en complejos insolubles presentes en la fracción de matriz nuclear (López-Turiso et al., 1990). Por último, se ha observado la asociación de PA con CHD6, proteína perteneciente a una familia de remodeladores de cromatina (Lutz et al., 2006) y resultados preliminares sugieren que está implicada en el ciclo viral (R. Alfonso, resultados no publicados).

### 3.3.- Factores implicados en la transcripción y replicación viral

En cuanto a factores celulares que puedan regular de alguna manera la síntesis de los RNAs virales, se han descrito proteínas que intervienen en procesos variados de la transcripción celular. Se ha descrito la asociación de la polimerasa

viral con la subunidad mayor de la RNAP II, mas precisamente con las formas hipofosforilada y fosforilada en Serina 5 (Ser5) del CTD (Engelhardt et al., 2005), así como también la interacción con regiones promotoras de genes regulados por la RNAP II (Chan et al., 2006), con lo que se acoplaría estructural y funcionalmente a las maquinarias de síntesis de los mRNAs celulares. También se han descrito interacciones con proteínas relacionadas con la transcripción general, como PA con hCLE (Huarte et al., 2001); Ebp-1 (*Erb-B3 binding protein 1*), un inhibidor selectivo de la polimerasa viral que se une a la RNP a través de la subunidad PB1 (Honda et al., 2007); la RNP con PARP-1 (*poly-adenyl-ribosyl-polymerase 1*) y DDB1 (*DNA-damage binding protein 1*) (Mayer et al., 2007), y de la polimerasa con NXP-2 y DDX5 (Jorba et al., 2008b), ambas implicadas en la activación y represión de la transcripción celular en distintas situaciones (Bates et al., 2005; Kimura et al., 2002; Rosendorff et al., 2006; Watanabe et al., 2001). El complejo celular MCM, una DNA helicasa replicativa implicada en la progresión del ciclo celular, interactúa con las RNPs a través de la subunidad PA y estabiliza el cRNA naciente con la polimerasa viral (Kawaguchi and Nagata, 2007). La ausencia del complejo MCM tiene como consecuencia la síntesis abortiva de cRNAs cortos, que al no tener una interacción estable con la polimerasa, son liberados del complejo. El factor Tat-SF1 interactúa con NP libre y estimula la síntesis de RNA viral promoviendo la formación de complejos RNA-NP (Naito et al., 2007a). Además, se ha descrito que la interacción de PB2 con  $\alpha$ -importinas es requerida para la replicación viral (Res-

Infante et al., 2008).

También se han descrito asociaciones del virus con la maquinaria de *splicing* celular, como la interacción entre NP libre y UAP56 (también llamada BAT1, NPI-5 o RAF2p48) lo que promueve la asociación de NP con el RNA viral nascente para constituir las RNPs progenie (Momose et al., 2001); la asociación entre NS1 y U6 snRNAs (Lu et al., 1994) que inhibe los procesos de *splicing* de pre-mRNAs celulares (Qiu et al., 1995), y las recientemente identificadas de la polimerasa con SFPQ/PSF, hnRNP M, hnRNP H1 y DDX5 (Jorba et al., 2008b), proteínas implicadas en la formación del *spliceosome* o en las etapas tempranas del *splicing* (Kafasla et al., 2002; Lin et al., 2005; Liu, 2002; Shimizu et al., 1999). Algunas de las interacciones con la maquinaria de *splicing* celular podrían servir al virus para procesar sus propios pre-mRNAs, mientras que otras de estas interacciones podrían cumplir la función de bloquear el procesamiento de los pre-mRNAs celulares y contribuirían así al *shut off*.

El virus también establece interacciones con algunas proteínas implicadas en el corte y poliadenilación y en la exportación de los mRNAs, como NS1, que interacciona con la subunidad de 30 kDa del factor CPSF (*cleavage/polyadenylation specificity factor*) (Nemeroff et al., 1998) y con PABP-N1 (PABP-II) (Chen et al., 1999), inhibiendo la formación del extremo 3' de los mRNAs celulares.

### 3.4.- Factores implicados en la traducción viral

Durante la infección por el virus de la gripe, se produce una fuerte inhibición de la síntesis de proteínas celulares, y una

traducción selectiva de mRNAs virales. Se ha identificado la región 5' no traducida (5' UTR) de los mensajeros virales como importante para la ventaja traduccional de estos mRNAs (Garfinkel and Katze, 1993), y se ha descrito la interacción de estas secuencias con el autoantígeno La y con la proteína celular GRSF-1 (*G-rich sequence factor 1*). Mientras que no existen datos que permitan relacionar la interacción de La con ninguna función del virus, sí se ha visto que la unión de GRSF-1 aumenta la traducibilidad al menos del mRNA de NP (Park et al., 1999).

Otros factores relacionados con traducción que establecen interacciones con proteínas virales son PAPB-1 y eIF4G-I, que se unen directamente a NS1 (Aragón et al., 2000; Burgui et al., 2003), estimulando la traducción de los mensajeros del virus, mientras que la polimerasa viral, se asocia con la proteína S3 de la subunidad 40S del ribosoma (Jorba et al., 2008b) y con el complejo de pre-iniciación de la traducción (Burgui et al., 2007). Mas precisamente, la región comprendida por los residuos 538 al 693 de la subunidad PB2 de la polimerasa viral interacciona con eIF4GI (E. Yanguéz, datos no publicados).

También se ha descrito la interacción de hStaufen-1, una proteína cuya actividad se relaciona con el transporte de mRNAs que van a sufrir traducción localizada, especialmente en células nerviosas, con NS1 (Falcón et al., 1999) y con las vRNPs y resultados preliminares sugieren que podría estar implicada en la morfogénesis viral (S. de Lucas, resultados no publicados).

### 3.5.- Proteínas celulares implicadas en otras funciones

Se ha descrito la interacción de NS1 con un factor celular llamado NS1-I (Wolff et al., 1996), que es el homólogo humano del precursor de la 17 $\beta$ -estradiol deshidrogenasa porcina, y hasta el momento se desconoce de qué manera puede esta interacción participar en el ciclo de infección viral.

Recientemente se ha descrito la interacción de la proteína viral PB1-F2 con ANT3 (*adenine nucleotide translocator 3*) y VDAC-1 (*voltage-dependent anion channel 1*) (Zamarin et al., 2005), dos componentes del complejo del poro mitocondrial, imprescindible para mantener el potencial de membrana en la mitocondria. Se piensa que a través de estas interacciones, el virus induce la permeabilización mitocondrial y así provoca la activación de la apoptosis celular (Takahashi et al., 2007; Zamarin et al., 2005). La proteína COXA1, componente del complejo citocromo c oxidasa, parece estar implicada en el ciclo viral. En ausencia de esta proteína se da una reducción de la síntesis del RNA viral (Hao et al., 2008). Dado que PB2 tiene una señal de localización mitocondrial (Carr et al., 2006) y que PB1-F2 se encuentra en las membranas mitocondriales, este orgánulo debe de estar implicado en algún modo con el ciclo viral, aunque de momento no se sabe con certeza su papel.

La célula desarrolla mecanismos antivirales en respuesta a la infección, como la activación de la enzima PKR, que reduce la capacidad traduccional de la célula dificultando la síntesis de proteínas virales. El virus, a su vez, pone en marcha sus propios mecanismos para contrarrestar la defensa de la célula. El factor viral más importante para este cometido es NS1, que interacciona directamente con PKR

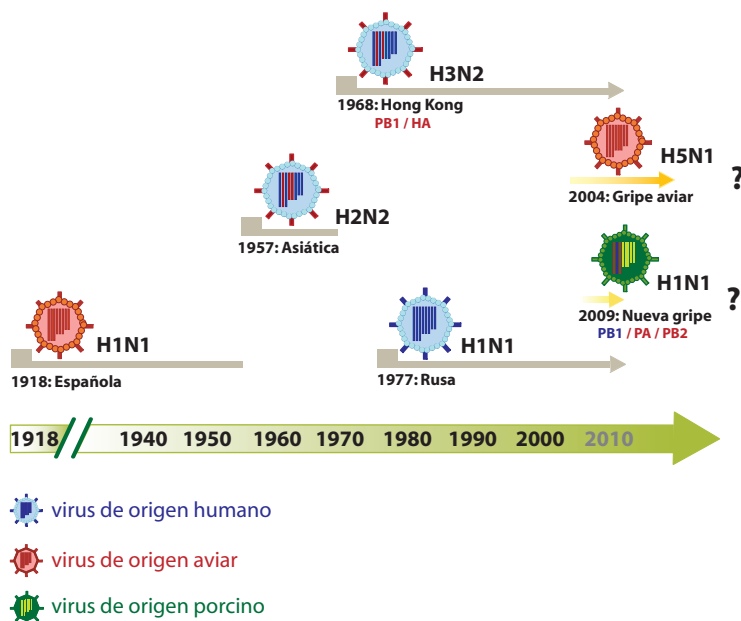
(Tan and Katze, 1998) e impide que se una a su activador (Li et al., 2006) y también es capaz de unir RNA de doble banda y así impedir la activación de PKR (Lu et al., 1995). Además, se ha observado que las proteínas Mx-GTPasas inhiben la transcripción viral mediante la formación de un complejo con PB2 y NP (Turan et al., 2004; Zurcher et al., 1992).

### 3.6.- Proteínas celulares presentes en los viriones del virus de la gripe

En un estudio reciente se han identificado 36 proteínas celulares incorporadas en los viriones del virus de la gripe. Entre ellas se encuentran tanto proteínas citoplásmicas como de membrana, tales como proteínas del citoesqueleto, miembros de la familia de las anexinas, enzimas glicolíticas ciclofilina A y CD59 (Shaw et al., 2008).

## 4.- PATOGÉNESIS Y RANGO DE HOSPEDADOR DEL VIRUS DE LA GRIPE

Los virus de la gripe tipo A causan epidemias anuales que producen miles de muertes y hospitalizaciones en todo el mundo. Periódicamente, emergen nuevas cepas altamente virulentas que contienen en su superficie una HA para la cual la población mundial es inmunológicamente *naïve* y causan pandemias globales. Durante los últimos 100 años han ocurrido varias pandemias (**Figura 8**). En 1918 ocurrió la enfermedad infecciosa más devastadora, la llamada gripe española, un virus H1N1 de origen aviar, aunque con algunos rasgos característicos de cepas humanas, que se cree que se transmitió de forma directa de aves a humanos y se



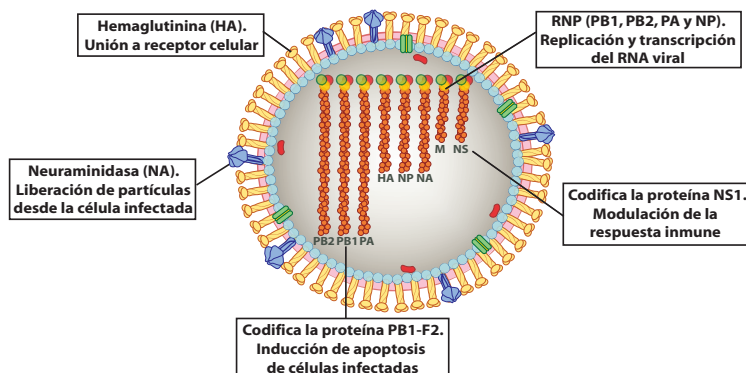
**Figura 8. Pandemias producidas por el virus de la gripe.**

Se indica el año en que se inició la pandemia, el origen y subtipo del virus pandémico y el nombre que se le asignó a la pandemia producida. En el caso de los virus que produjeron las pandemias Asiática y de Hong Kong, se indican los segmentos que dieron origen al virus *reassortant*, siendo de origen humano los segmentos representados en azul y de origen aviar los representados en rojo.

estima que causó 50 millones de muertos en todo el mundo (Johnson and Mueller, 2002). En 1957 un virus H2N2 de origen aviar provocó una pandemia conocida con el nombre de gripe asiática, la cual se cree que produjo 4 millones de muertes (Peiris et al., 2007). En 1968, el virus aviar H3N2 desplazó a la cepa H2N2 y provocó la pandemia conocida como gripe de Hong Kong en la que fallecieron 1 millón de personas (Peiris et al., 2007). En 1977 se produjo una re-emergencia de la cepa H1N1 que provocó la pandemia llamada gripe rusa (Webster et al., 1992). Desde hace unos años se predice que en cualquier momento puede producirse una pandemia por un virus aviar altamente patógeno H5N1 que ya ha provocado varios brotes en distintos países con mas de 400 personas infectadas y una tasa de mortalidad en torno al 60% (WHO), pero

de momento este virus aviar no ha podido pasar totalmente la barrera inter-especie ya que no se ha adaptado definitivamente para la transmisión de humano a humano. Aunque se cree que la cepa H5N1 es el principal peligro de pandemia, también se piensa que esta podría ser producida por cepas H7N7 o H9N2, las cuales en los últimos años también han provocados brotes en aves de corral con transmisión ocasional a humanos (Fouchier et al., 2004; Koopmans et al., 2004; Kurtz et al., 1996; Peiris et al., 1999; Webster et al., 1981). Sin embargo, ha sido un virus porcino H1N1, aunque con características tanto aviares como humanas además de las porcinas (Garten et al., 2009), el que ha surgido recientemente en Norteamérica y se ha distribuido rápidamente a casi todo el mundo provocando que la Organización Mundial de la Salud decretara el estado de





**Figura 9. Determinantes de rango de hospedador y patogenicidad de los virus de la gripe.**

Se indican las funciones de las ocho proteínas virales que se discuten en el texto principal como importantes determinantes de rango de hospedador y patogenicidad.

alerta pandémico.

A lo largo de los años se han realizado muchos esfuerzos para conocer los factores que determinan tanto el rango de hospedador como la patogenicidad de los virus de la gripe tipo A (**Figura 9**). Entre los factores virales que tienen un papel clave en la virulencia son particularmente importantes las glicoproteínas HA y NA, los componentes del complejo de la polimerasa y las proteínas no estructurales PB1-F2 y NS1 (revisado en (Neumann and Kawaoka, 2006)). Sin embargo, sólo se han caracterizado unos pocos determinantes genéticos de un reducido número de cepas particularmente virulentas, las cuales se describen a continuación.

#### 4.1.- Las glicoproteínas virales HA y NA

La infectividad del virus está determinada por el reconocimiento de los ácidos siálicos (SA) presentes en la superficie celular y por la discriminación del tipo de unión entre los SA y la galactosa. Los virus humanos reconocen preferencialmente los enlaces  $\text{Sa}\alpha 2,6\text{Gal}$ , mientras que los virus aviares se unen preferentemente a

enlaces  $\text{Sa}\alpha 2,3\text{Gal}$  (Rogers and Paulson, 1983; Rogers et al., 1983). En los humanos, los  $\text{Sa}\alpha 2,6\text{Gal}$  se encuentran en el tracto respiratorio superior, mientras que en el tracto respiratorio inferior están presentes los enlaces  $\text{Sa}\alpha 2,3\text{Gal}$  (Couceiro et al., 1993; Matrosovich et al., 2004). Por su parte, las aves presentan enlaces  $\text{Sa}\alpha 2,3\text{Gal}$  en las células del tracto digestivo, donde el virus replica. Pese a estas diferencias, los virus aviares pueden infectar y replicar en el tracto respiratorio inferior de los humanos, aunque la dispersión de humano a humano no es efectiva. Para que esto ocurra, la HA debe mutar para unirse preferencialmente a enlaces  $\text{Sa}\alpha 2,6\text{Gal}$ . De hecho, los virus pandémicos de 1918, 1957 y 1968 reconocen preferentemente enlaces  $\text{Sa}\alpha 2,6\text{Gal}$ . Por su parte, el tracto respiratorio de los cerdos presenta ambos tipos de enlaces (Ito et al., 1998), lo que probablemente explica la alta susceptibilidad de estos animales a la infección por virus tanto humanos como aviares (Kida et al., 1994).

Por su parte, el sitio de corte de HA es un determinante de patogenicidad. La proteína HA se expresa como un precursor

que posteriormente es cortado en dos subunidades. Este corte es un prerrequisito para la fusión de las membranas endosomal y viral, y por lo tanto, para la infectividad viral (Garten and Klenk, 1999). Los virus de baja patogenicidad presentan un sitio de corte sólo reconocido por proteasas extracelulares tipo tripsina que se cree que son secretadas solo en el epitelio respiratorio en el caso de mamíferos y por células del tracto intestinal de aves. Por lo tanto, estos virus solo pueden infectar células del tracto respiratorio de humanos. Por el contrario, los virus más patogénicos poseen múltiples aminoácidos básicos en el sitio de corte que son reconocidos por proteasas intracelulares ubicuas tipo furina (Garten and Klenk, 1999) y por lo tanto pueden producir infecciones sistémicas (Claas et al., 1998; Fouchier et al., 2004; Hatta et al., 2001; Horimoto and Kawaoka, 1994; Subbarao et al., 1998).

La eficiente liberación de los viriones progenie de la célula infectada requiere la eliminación del SA por la glicoproteína NA. Por lo tanto, las propiedades de reconocimiento de las proteínas HA y NA y los enlaces de los SA a la galactosa deben ser similares. Además, la longitud del tallo de NA, que separa la región con el centro enzimático de los dominios transmembrana y citoplasmático, determina la eficiencia de liberación de la progenie (Blok and Air, 1982; Els et al., 1985; Luo et al., 1993). Sin embargo, algunos de los virus H5N1 altamente patogénicos aislados recientemente en aves de corral presentan un tallo de NA corto (Li et al., 2004a).

#### 4.1.2.- Los componentes de la RNP

Experimentos clásicos de coinfección o genética reversa sugieren que

la polimerasa viral y NP también contribuyen al rango de hospedador y a la patogenicidad. En concreto, la mutación K627E es un determinante importante de patogenicidad. Una lisina en la posición 627 de PB2 presente en todos los virus humanos determina una alta patogenicidad en ratones, mientras que un glutámico, que se encuentra en todos los virus aviares, es responsable de una baja patogenicidad (Hatta et al., 2001; Subbarao et al., 1993). Una lisina en la posición 627 de PB2 favorece la actividad de la polimerasa y la replicación a 37°C, es decir, es una mutación de adaptación al frío ya que los virus aviares replican en el tracto digestivo de las aves que se encuentra a 41°C. Por tanto, PB2 no afecta al tropismo celular del virus sino a la habilidad replicativa en ratones y probablemente en humanos. Existen numerosas evidencias que sugieren que una mutación de glutámico a lisina en la posición 627 de PB2 permite a los virus aviares crecer eficientemente en humanos, siendo por tanto, un importante determinante del rango de hospedador (Fouchier et al., 2004; Naffakh et al., 2000; Puthavathana et al., 2005; Subbarao et al., 1993). También se ha descrito que la interacción de PB2 y NP con la importina  $\alpha$  es un determinante del rango de hospedador (Gabriel et al., 2008).

Numerosas publicaciones resaltan la importancia del complejo de la polimerasa viral en la patogénesis (Hulse-Post et al., 2007; Rolling et al., 2009; Salomon et al., 2006; Watanabe et al., 2009). Un total de diez cambios de aminoácido en las proteínas de la polimerasa diferencian la cepa extremadamente patogénica de 1918 de la secuencia consenso para virus aviares, y un notable número de estos



cambios se han encontrado recientemente en los virus H5N1 altamente patogénicos que han causado muerte en humanos (Taubenberger et al., 2005). También se ha descrito que mutaciones en la polimerasa que producen un aumento de su actividad en células de mamífero son responsables de la adaptación de un virus aviar H7N7 altamente patogénico a ratones (Gabriel et al., 2005), y que este aumento está unido a un descenso de la actividad en células aviares (Gabriel et al., 2007), por lo que se puede considerar a la eficiencia de la polimerasa viral como un determinante de rango de hospedador y patogenicidad. Además, se ha descrito que entre los factores de virulencia claves que diferencian un virus PR8 altamente patogénico de la cepa *wild-type*, los genes de la polimerasa, junto con HA y NA, son los que contribuyen a dicha patogenicidad (Grimm et al., 2007).

#### **4.1.3.-La proteína NS1 como antagonista de la respuesta antiviral**

La patogénesis depende parcialmente de la habilidad del virus para evadir o suprimir la respuesta inmune del hospedador. La proteína NS1 tiene un papel central en este proceso al contrarrestar la respuesta celular mediada por interferón (IFN) de dos maneras distintas: 1) uniendo RNA de doble cadena y por consiguiente suprimiendo la activación de PKR, un conocido estimulador del IFN tipo I, y 2) previniendo la activación de factores de transcripción como ATF-2/c-Jun, IRF-3 y NFκB, todos los cuales estimulan la producción de IFN (García-Sastre, 2004; Krug et al., 2003). Por otro lado, distintos virus H5N1 son potentes inductores de genes de citoquinas proinflamatorias

como *tumor necrosis factor-α* (TNF-α) o IFN-β (Cheung et al., 2002; Guan et al., 2004). Además, virus H5N1 altamente patogénicos con una mutación en la proteína NS1 también son resistentes al efecto antiviral de IFN y TNF-α (Seo et al., 2002, 2004). Estas observaciones indican que la proteína NS1 induce un desbalance en las citoquinas que probablemente contribuye a la extrema patogenicidad de los virus aviares en humanos.

Por otro lado, se ha descrito que los cuatro residuos C-terminales de NS1 constituyen un dominio de unión a módulos de interacción proteína-proteína PDZ, los cuales están implicados en diversas cascadas de señalización celular (Sheng and Sala, 2001), y que la interacción de esta región con proteínas conteniendo dominios PDZ modula la patogenicidad viral (Jackson et al., 2008).

#### **4.1.4.- La proteína pro-apoptótica PB1-F2**

La proteína PB1-F2 ha sido relacionada con la inducción de procesos de apoptosis durante la infección (Chen et al., 2001; Zamarin et al., 2005) y es un importante factor de patogenicidad (Conenello et al., 2007; Zamarin et al., 2006) que favorece la aparición de infecciones bacterianas secundarias (McAuley et al., 2007).

### **5.- BÚSQUEDA DE FACTORES CELULARES QUE INTERACIONARAN CON PA**

En nuestro laboratorio se han estudiado y caracterizado varios aspectos de la función de la subunidad PA de la polimerasa viral, y como parte de este estudio, se llevó a cabo

un ensayo de doble híbrido en levaduras, con el objetivo de encontrar nuevos factores que pudieran interaccionar con ella y posiblemente ejercer algún efecto en sus actividades. De esta búsqueda se aislaron dos clones: PAi1, que resultó ser la proteína CHD6 (antes conocida como CHD5) (Schuster and Stoger, 2002), que pertenece a la familia CHD de remodeladores de cromatina dependientes de ATP y que podría estar implicada en transcripción (Lutz et al., 2006) y PAi13, que es la proteína hCLE/CGI-99, cuya implicación en la infección por el virus de la gripe es uno de los objetivos de esta tesis.

La proteína identificada como PAi13 compartía un alto grado de homología con la proteína CLE7 de *Gallus gallus*, por lo que se la llamó hCLE, y su secuencia coincidía con la publicada para el mRNA CGI-99 (Lai et al., 2000). hCLE es una proteína de 244 aminoácidos, cuya secuencia es idéntica en un 81% a CLE7 de *Gallus gallus*. Howng y colaboradores han descrito que hCLE interacciona con nineína, bloqueando la fosforilación de esta proteína por GSK3 $\beta$ . Además, hCLE dimeriza y posee una actividad transcripcional en su N-terminal (Howng et al., 2004). En nuestro laboratorio se determinó que hCLE se expresaba en todos los tejidos analizados, y en cuanto a su caracterización, se mostró que presenta localización nuclear y citosólica y que en separaciones por SDS-PAGE se comporta como una proteína de 32 kDa. Se estudió la interacción entre hCLE y PA, y se demostró que ambas proteínas interaccionan también *in vitro* y que los últimos 252 aminoácidos de PA son necesarios y suficientes para la interacción.

Además, se vio que hCLE copurificaba con RNPs virales activas reconstituídas *in vivo*, lo cual sugiere una relevancia funcional de la interacción (Huarte et al., 2001). Además se observó una interacción entre PB2 y hCLE tanto *in vitro* como *in vivo*, siendo la región N-terminal de PB2 suficiente para que ocurra esta interacción. También se vio que hCLE colocaliza en el núcleo de células infectadas con las RNPs virales, existiendo puntos nucleares en los que ambas colocalizan con la RNAP II (A. Pérez-González, resultados no publicados).

hCLE presenta un 38% de homología con la región central de la proteína Spt16 (Cdc68) de *Saccharomyces cerevisiae*, que es una proteína esencial en levadura implicada en la transactivación de muchos genes y en el mantenimiento de la represión mediada por la cromatina en ausencia de transactivadores (Evans et al., 1998). Spt16 se encuentra asociada a Pob3 formando el complejo CP (Brewster et al., 1998) y existen homólogos suyos en muchas especies, desde *Arabidopsis thaliana* (Duroux et al., 2004), DUF en *Xenopus laevis* (Okuhara et al., 1999), Dre4 en *Drosophila melanogaster* (Sliter and Gilbert, 1992), y SPT16 en humanos (Orphanides et al., 1999). La proteína humana SPT16 también se asocia a otra proteína, SSRP1, que es homóloga a Pob3, y juntas forman el complejo homólogo a CP, denominado FACT (*f*acilitates *c*hromatin *t*ranscription). Todos los homólogos de Spt16 y los complejos que forman están implicados en diferentes aspectos de la transcripción celular. Debido a esto, en el laboratorio se analizó el posible papel de hCLE en la transcripción celular. Mediante ensayos de coimmunoprecipitación se

determinó que hCLE interacciona con la subunidad mayor de la RNAP II. Además, se observó por microscopía confocal que hCLE se encuentra presente en sitios donde se lleva a cabo una síntesis activa de RNA mediada por la RNAP II. Además, se analizó la expresión de genes por *microarray* en condiciones de silenciamiento de hCLE, observándose una disminución en la expresión de un importante número de genes pertenecientes a diferentes familias funcionales, lo que nos llevó a postular que hCLE es un modulador transcripcional de la RNAP II (Pérez-González et al., 2006). Por otra parte, trabajos de otros grupos que estudiaban la composición proteica de gránulos de transporte de mRNAs en células nerviosas, identificaron a hCLE/CGI-99 como factor integrante de estos macrocomplejos (Elvira et al., 2006; Kanai et al., 2004). No se conoce nada acerca de la función que puede desempeñar hCLE en estos gránulos, cuyo objetivo es el transporte de mRNAs a lugares concretos dentro de las células nerviosas para ser traducidos de manera localizada. Simultáneamente, utilizando una proteína recombinante hCLE-TAP nosotros hemos purificados, y analizado por MALDI-TOF, tanto complejos nucleares como citoplasmáticos en los que se encuentra hCLE. Algunas de las proteínas identificadas son comunes con aquellas encontradas en los estudios previos mencionados anteriormente (DDX1, Hsp70, HSPC117, PSF/SFPQ, NonO) o en otros gránulos de transporte de mRNAs conocidos (RNA helicasa A, miosina) (Brendel et al., 2004; Villacé et al., 2004). Estos datos sugieren que hCLE tiene, además de su implicación en la transcripción celular, una función adicional formando parte de

esta clase de ribonucleopartículas y que podría estar implicada de alguna manera en la selección, transporte y traducción de los mRNAs transportados. Además, hCLE se identificó como un componente del spliceosome mediante estudios proteómicos (Rappsilber et al., 2002).

La interacción física y funcional de hCLE con componentes de la polimerasa del virus de la gripe y con la RNAP II, hacen del estudio de la implicación funcional de hCLE durante el ciclo viral un tema clave para profundizar en el estudio de los mecanismos de interacción entre el virus de la gripe y la maquinaria de transcripción de la célula infectada, por lo que describiremos a continuación algunas características de los procesos que ocurren durante la transcripción celular.

## 6.- LA TRANSCRIPCIÓN CELULAR

La síntesis de un RNA mensajero en el núcleo de una célula eucariota es una tarea inmensamente compleja. Cada paso del recorrido requiere un número enorme de factores proteicos, e identificarlos y dilucidar su funcionamiento ha supuesto un objetivo fundamental de la biología molecular en las últimas décadas. Basándose en ensayos *in vitro* que mostraban que cada una de las etapas fundamentales, que son transcripción, *capping*, *splicing* y poliadenilación, podían llevarse a cabo de forma aislada, y porque intuitivamente cada una de estas reacciones parecía bastante distinta de las demás, se había supuesto que la maquinaria responsable de cada etapa era diferente y funcionaba esencialmente de manera independiente. Sin embargo, numerosos estudios en

los últimos años han aportado evidencia suficiente que indica que este no es el caso. Avances recientes en el campo de la regulación de la expresión génica indican que la transcripción está acoplada al procesamiento del mRNA, al “control de calidad” o *surveillance* del RNA y a su exportación, y la RNAP II aparece como un elemento integrador de todos estos procesos.

### 6.1.- El CTD de la RNAP II desempeña un papel fundamental

La subunidad mayor de la RNAP II es la proteína Rpb1 y posee un dominio único, sin relación con otras regiones de proteínas conocidas, en su extremo carboxilo, denominado CTD (carboxy-terminal domain). El CTD consta de múltiples repeticiones de un heptapéptido evolutivamente conservado cuya secuencia consenso es Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser. El número de repeticiones varía entre los distintos organismos, desde 26-27 en levaduras hasta 52 en mamíferos (**Figura 10A**). El CTD interacciona físicamente con un enorme número de proteínas y puede actuar de plataforma para la unión de factores necesarios en distintas etapas de la maduración del mRNA que tienen lugar asociadas a la elongación de la transcripción. EL CTD podría reclutar estos factores de manera que se unieran a héptadas específicas, lo cual implicaría un “código” en la secuencia degenerada de sus repeticiones (revisado en (Buratowski, 2003)).

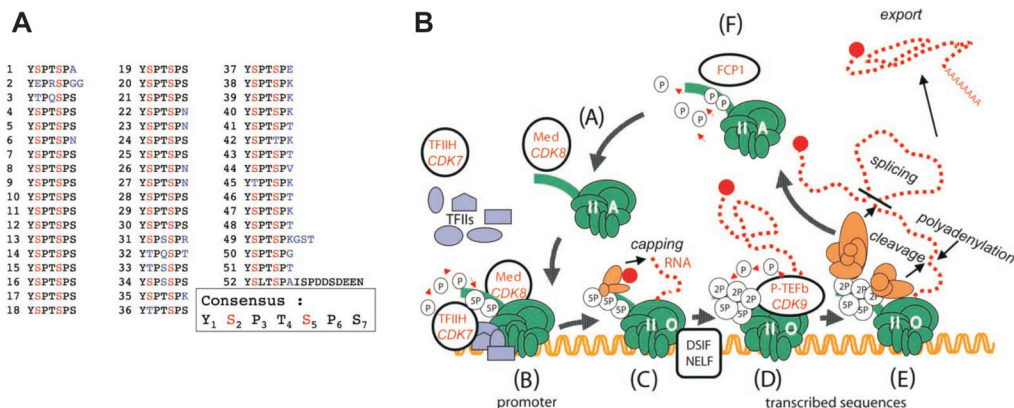
El CTD es rico en aminoácidos susceptibles de ser fosforilados, y está sujeto a fosforilación y defosforilación a lo largo del ciclo de transcripción. La RNAP II cuyo CTD está defosforilado se denomina RNAP

IIA, y se encuentra incluida en el complejo de preiniciación formado en el promotor, mientras que la RNAP II hiperfosforilada en su CTD se denomina RNAP IIO y se asocia a complejos de elongación. Otras modificaciones que puede sufrir el CTD son glicosilaciones e isomerización cis-trans de las prolinas (revisado en (Meinhart et al., 2005)).

## 6.2.- Etapas de la transcripción celular

### 6.2.1.- Iniciación de la transcripción

El ciclo de la transcripción comienza con la unión de activadores a la región *upstream* del promotor básico. Este suceso desencadena el reclutamiento de los complejos adaptadores, como SAGA (revisado en (Green, 2005)) o *mediator*, que a su vez facilitan la unión de los factores de transcripción generales, o GTFs (TFIID, TFIIB, TFIIE, TFIIIF y TFIIH) y otros cofactores (revisado en (Orphanides et al., 1996)). La RNAP IIA se posiciona en el promotor principal mediante la participación de TFIID, TFIIA y TFIIB, para dar lugar a la forma cerrada del complejo de preiniciación (PIC, *Preinitiation Complex*) (**Figura 10B (B)**). TFIIH tiene una subunidad con actividad helicasa de DNA dependiente de ATP que, con la participación de TFIIE, es capaz de desenrollar entre 11 y 15 pares de bases del DNA para poder introducir el molde de cadena sencilla en el centro activo de la RNAP II, formando así la forma abierta del complejo y dando lugar el comienzo de la síntesis del RNA (**Figura 10B (C)**) (Goodrich and Tjian, 1994; Holstege et al., 1996; Kim et al., 2000). El CTD de la RNAPII es fosforilado por la subunidad CDK7 de TFIIH y por CDK8 del complejo *mediator* en las Ser5 del heptapéptido



**Figura 10. La Transcripción celular**

**A.** Alineamiento de los 52 heptapéptidos que componen el dominio carboxilo terminal (CTD) de la subunidad mayor de la RNAP II humana. Se puede ver que la serina en posición 7 del heptapéptido no está conservada en la región C-terminal del CTD. Las serinas 2 y 5, los residuos preferentemente fosforilados, se muestran en rojo. Los aminoácidos no conservados se muestran en azul. **B.** Representación esquemática de las etapas de la transcripción celular en la que se muestran los ciclos de fosforilación / defosforilación del CTD de la RNAP II y los principales factores que participan en cada fase. (A) Reciclaje. (B) Preiniciación. (C) Iniciación. (D) Elongación. (E) Procesamiento del RNA y terminación de la transcripción. (F) Defosforilación del CTD para su posterior reciclaje. Tomado de Palancade y Bensaude, 2003.

repetido durante la transcripción de los primeros 30 nucleótidos, y pierde así las interacciones con los GTFs antes de proceder a la fase de elongación. Mientras tanto, el CTD fosforilado comienza a reclutar los factores que van a participar en la elongación y en el procesamiento del mRNA.

### 6.2.2.- Elongación de la transcripción

Durante años se había considerado la elongación de la transcripción como la simple adición de nucleótidos a la cadena creciente del mRNA. Ahora resulta evidente que se trata de una etapa dinámica y altamente regulada del ciclo de transcripción, capaz de coordinar eventos venideros dentro del proceso de la síntesis del mRNA maduro. Muchos pasos en la maduración del mRNA, incluidos *capping*, *splicing*, procesamiento

del extremo 3', "control de calidad" o *surveillance* y exportación, se modulan mediante interacciones con el complejo de elongación de la transcripción. A diferencia de los factores de iniciación, los factores de elongación se unen a la maquinaria de transcripción a través de interacciones directas o indirectas con el CTD de la RNAP II (revisado en (Buratowski, 2003)). El CTD sufre una fosforilación adicional en las Ser2 en la etapa de elongación llevada a cabo por CDK9, que forma parte del complejo P-TEFb junto con la ciclina T1 (**Figura 10B (D)**).

### 6.2.3.- Capping del mRNA

La estructura cap que se encuentra en el extremo 5' de todos los mRNAs eucariotas se forma muy poco después de la iniciación de la transcripción, cuando las cadenas nacientes de mRNA tienen una longitud

de entre 25 y 30 nucleótidos (Coppola et al., 1983; Jove and Manley, 1984).

Datos aportados por estudios estructurales muestran que una vez que el RNA nascente tiene una longitud de aproximadamente 18 nucleótidos, se hace accesible a la maquinaria de procesamiento. Estas observaciones son coherentes con el acoplamiento del *capping* a las etapas tempranas de la transcripción (Chung et al., 2003; Kettenberger et al., 2003).

Posteriormente a la iniciación, los complejos DSIF (formado por SPT4 y SPT5) y NELF (Negative Elongation Factor) inducen el *transcriptional arrest*, permitiendo el reclutamiento de la maquinaria de *capping* por parte de la RNAP II fosforilada en Ser5 (Lindstrom et al., 2003; Pei et al., 2003; Pei and Shuman, 2002; Wen and Shatkin, 1999). El factor P-TEFb (Positive Transcription Elongation Factor) actúa entonces para liberar a la RNAP II de los efectos de DSIF y NELF, fosforilando a estos dos factores negativos y también la Ser2 del CTD (Fujinaga et al., 2004; Yamada et al., 2006b) gracias a su subunidad CDK9. Se ha visto que la fosfatasa FCP1 es necesaria para que la maquinaria de *capping* pueda abandonar el complejo de transcripción una vez finalizada su función (Schroeder et al., 2000). La actividad de TFIIS también es importante para que la RNAP II supere esta pausa, ya que estimula la actividad exonucleasa de la RNAP II, que rompe los enlaces erróneos que dan lugar a alineamientos incorrectos entre el mRNA y el molde en un proceso llamado *backtracking* (Adelman et al., 2005). Superada la pausa, se da la transición a la elongación productiva, y NELF se libera del complejo de elongación mientras que

DSIF permanece unido, pudiendo ejercer alguna función posterior en transcripción (Hartzog et al., 1998).

#### 6.2.4.- *Splicing*

El *splicing* de los precursores del mRNA tiene lugar en un gran complejo macromolecular denominado *spliceosome*, compuesto por snRNPs (small nuclear ribonucleoprotein particles) y proteínas que no son de esta categoría, incluidas algunas de la familia de proteínas ricas en serina/arginina (SR) (Kramer, 1996; Manley and Tacke, 1996; Moore and Sharp, 1993).

De la misma manera que se ha visto con el *capping*, trabajos recientes han sugerido que el *splicing* ocurre cotranscripcionalmente. Estudios *in vitro* e *in vivo* han apoyado la existencia de interacciones funcionales entre el CTD de la RNAP II y la maquinaria de *splicing*. La forma hiperfosforilada, RNAP II<sub>0</sub>, se ha encontrado asociada a factores de *splicing* y está presente en *spliceosomes* activos (Chabot et al., 1995; Kim et al., 1997a; Mortillaro et al., 1996; Yuryev et al., 1996). Estos y otros trabajos más recientes (Hirose et al., 1999), no sólo aportan evidencias de que la RNAP II controla la distribución espacial de los factores de procesamiento del pre-mRNA y acopla el procesamiento a la transcripción, sino que ésta interacciona directamente con factores de *splicing* para que el *splicing* tenga lugar de manera más eficaz. Más aun, estos estudios también sugieren que el diferente estado de fosforilación del CTD puede tener un papel significativo en la regulación del *splicing*.

#### 6.2.5.- Poliadenilación

La poliadenilación del mRNA tiene lugar



en dos etapas: el corte endonucleolítico del pre-mRNA y la adición de poliadeninas al extremo 3' del mRNA cortado (**Figura 10B (E)**). La poliadenilación del mRNA requiere múltiples factores proteicos, siendo los principales en mamíferos el factor CPSF (cleavage/polyadenilation specificity factor), el CstF (cleavage stimulation factor), dos factores de corte, CFI y CFII, y la poli(A) polimerasa (revisado en (Colgan and Manley, 1997; Zhao et al., 1999)). Inesperadamente, varios estudios coinciden en que al menos algunos factores de *splicing*, como es el caso de CPSF, se reclutan al complejo de transcripción desde el promotor y viajan acoplados a él desde la iniciación hasta después del corte y poliadenilación (Dantonel et al., 1997; McCracken et al., 1997).

#### 6.2.6.- Terminación de la transcripción

La terminación del mRNA es un proceso distinto del corte y la poliadenilación y supone la liberación del producto de la transcripción. Se ha descrito que la RNAP II puede continuar transcribiendo hasta 2 kb después del paso de corte, aunque se sabe que tanto el corte como una correcta señal de poliadenilación son necesarios para que tenga lugar la terminación (revisado en (Proudfoot, 1989)). No se conoce el mecanismo preciso que sigue la RNAP II en esta etapa, y se ha propuesto que la polimerasa es modificada de alguna manera cuando pasa la señal de poliadenilación, y esto hace que sea menos procesiva y, como consecuencia, más propensa a terminar (revisado en (Hirose and Manley, 2000)). A pesar de que posiblemente intervengan numerosos factores en esta etapa, sólo se ha descrito

un factor específico de terminación, TTF2 (Jiang and Price, 2004).

#### 6.2.7.- Reciclaje

A fin de que la RNAP II pueda volver a transcribir, es necesario su reciclaje (**Figura 10B (F)**) a la forma hipofosforilada RNAP IIA, capaz de interactuar con las secuencias cercanas al promotor y así poder reiniciar un nuevo ciclo de transcripción (**Figura 10B (A)**). Este reciclaje lo llevan a cabo diversas fosfatasas. Se ha descrito que la fosfatasa FCP1 defosforila las Ser2 (Cho et al., 1999) del CTD, mientras que las fosfatasas específicas de la Ser5, son las SCPs (small CTD phosphatases) y SSU72 (Ganem et al., 2003; Meinhart et al., 2005; Yeo et al., 2003). Las SCPs están reguladas por TFIIF (Yeo et al., 2003). SSU72 presenta interacciones genéticas con TFIIB y se asocia con subunidades de la maquinaria de procesamiento del extremo 3' (Gavin et al., 2002; Sun and Hampsey, 1996). Se piensa que FCP1 defosforila las Ser2 del CTD, y SSU72 hará lo mismo con las Ser5 a medida que la RNAP II alcanza el final del gen. Las SCPs podrían tener un papel en la transición de iniciación a elongación, defosforilando Ser5 en una manera dependiente de regulación por TFIIF.

El virus de la gripe, al igual que otros virus, es un ejemplo de máxima optimización de una limitada capacidad codificante, habiendo evolucionado de manera que aprovecha los mecanismos propios de la célula favoreciendo la replicación viral al tiempo que inhibe las funciones celulares. Sin duda, los factores celulares juegan un papel esencial en la infección por el virus de la gripe y son muchos los mecanismos

del virus que implican la participación de proteínas celulares, si bien sólo conocemos algunas de ellas. Hoy en día, el interés de muchos laboratorios está orientado hacia el estudio de las interacciones del virus con la célula, estudios que llevarán a comprender mejor los propios mecanismos virales.











Estudios previos en nuestro laboratorio habían identificado a la proteína celular hCLE como un factor asociado a la polimerasa del virus de la gripe a través de la interacción con las subunidades PA y PB2. Además, hCLE interacciona con la RNA polimerasa II (RNAP II) y modula su actividad. Por otra parte, además de la conocida dependencia que la transcripción viral tiene de la actividad de la RNAP II, se ha descrito una asociación física entre la polimerasa viral y las formas defosforilada y fosforilada en Serina 5 de la RNAP II. Esto nos motivó a evaluar la relevancia de dichas interacciones para la infección por el virus de la gripe.

Con estos antecedentes nos propusimos los siguientes objetivos concretos:

- 1.- Estudiar la relevancia funcional de la proteína celular hCLE en la infección por el virus de la gripe.
- 2.- Analizar el efecto que la infección por el virus de la gripe tiene sobre la maquinaria de transcripción celular.
- 3.- Analizar la relación entre el efecto que la infección con el virus de la gripe tiene sobre la maquinaria de transcripción celular y la patogenicidad viral.



**MATRIALES  
Y MÉTODOS**





## MATERIALES BIOLÓGICOS

patogenicidad (Grimm et al., 2007); A/Ann Arbor/6/60 *cold-adapted* (AA).

### 1.- LÍNEAS CELULARES EUCARIOTAS

Las líneas celulares utilizadas fueron las siguientes:

- ✓ MDCK (NLB2): células de riñón de perro cedidas por T. Zürcher y obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC).
- ✓ HeLa: células epiteliales humanas procedentes de un adenocarcinoma cervical obtenidas de la ATCC.
- ✓ COS-1: células de riñón de mono verde africano cedidas por Y. Gluzman (Gluzman, 1981).
- ✓ NIH-3T3: fibroblastos de ratón obtenidos de la ATCC.
- ✓ A549: células de carcinoma de pulmón humanas cedidas por J.A. Melero.
- ✓ HEK-293T: células embrionarias humanas de riñón cedidas por J.C. de la Torre (DuBridge et al., 1987).
- ✓ DF-1: fibroblastos de embrión de pollo cedidos por M. Esteban.

### 2.- ESTIRPES BACTERIANAS

La cepa bacteriana utilizada para la amplificación de todos los plásmidos fue *E. coli* DH5 $\alpha$ .

### 3.- VIRUS

#### 3.1.- Cepas de virus de la gripe de laboratorio

A/Victoria/3/75 (H3N2) (VIC); A/WSN/33 (H1N1) (WSN); A/PR/8/34 (H1N1) (PR8), virus PR8 de alta (hvPR8) y baja (lvPR8)

#### 3.2.- Cepas de virus de la gripe de campo

A/New Caledonia/20/99 (H1N1) (NC); A/England/1/51 (H1N1) (Eng); A/Wyoming/3/2003 (H3N2) (Wy); A/Vietnam/1203/04 (H5N1); A/turkey/Wisconsin/66 (H9N2).

#### 3.3.- Virus de la gripe recombinantes

Virus PR8 rescatado al que le falta el gene NS1 (delNS1) (García-Sastre et al., 1998); virus rescatado conteniendo los genes de la polimerasa (PB1, PB2 y PA) y NP de la cepa VIC y los demás genes de la cepa WSN, tanto con PA *wild-type* como con la mutación T157A (Huarte et al., 2003).

#### 3.4.- Otros virus

El virus Vaccinia recombinante vTF7-3, que expresa la RNA polimerasa del bacteriófago T7, fue cedido por B. Moss (Fuerst et al., 1987).

### 4.- PLÁSMIDOS

#### 4.1.- Plásmidos para la reconstitución de RNPs

Los plásmidos pCMV-PB1, pCMV-PB2, pCMV-PA y pCMV-NP, que codifican las subunidades de la polimerasa y NP de la cepa Victoria bajo el promotor inmediatamente temprano de citomegalovirus humano fueron construidos y cedidos por A. Falcón (Falcón et al., 2004).

Los plásmidos pGPB1, pGPB2, pGPA y pGNP que expresan los componentes de la RNP de la cepa Victoria bajo el promotor de T7 han sido descritos previamente

(Mena et al., 1994). El plásmido pT7NSCAT (-), que expresa el gen CAT en polaridad negativa flanqueado por los extremos 5' y 3' no codificantes del segmento NS fue descrito con anterioridad (Luytjes et al., 1989; Perales et al., 2000).

#### 4.2.- Plásmidos para rescate de virus recombinantes

Los plásmidos derivados de la cepa A/Victoria/3/75 (pHHPB1Vic, pHHPB2Vic, pHHPAVic, pHHPNPic, pHMMVic, pHHNSVic) fueron construidos y cedidos por A. Falcón y Y. Fernández (Falcón et al., 2004). Estos plásmidos codifican los RNAs virales bajo el promotor de la RNA polimerasa I.

Los plásmidos con los vRNAs de los segmentos de la cepa A/WSN/33 bajo el promotor de la RNA polimerasa I (pPOL-NA WSN, pPOL-HA WSN, pPOL-PB1 WSN, pPOL-PB2 WSN, pPOL-PA WSN, pPOL-NP WSN, pPOL-NS WSN, pPOL-M WSN), empleados para rescate de virus, fueron cedidos por Y. Kawaoka (Neumann et al., 1999).

Los plásmidos que expresan los vRNAs virales bajo el promotor de la RNA Pol I de la cepa A/PR/8/34 (pPoll-PB1 PR8, pPoll-PB2 PR8, pPoll-PA PR8, pPoll-NP PR8, pPoll-NS PR8, pPoll-M PR8) fueron cedidos por A. Garcia-Sastre (Schickli et al., 2001).

#### 4.3.- Plásmidos para la silenciamiento génico

El plásmido pSUPER que expresa siRNAs bajo el promotor H1 de la polimerasa III (Brummelkamp et al., 2002b) fue cedido por R. Agami.

El plásmido pSUPER.retro.puro (pSR-PURO) (Brummelkamp et al., 2002a) fue

adquirido a OligoEngine.

#### 4.4.- Otros plásmidos

El plásmido pCDNA-HA-hCLE que expresa la proteína hCLE con una etiqueta del epítipo de hemaglutinina (HA) fue construido y cedido por M. Huarte (Huarte et al., 2001).

Los plásmidos pGEM- $\beta$ -Tubulina y pGEM-Vimentina fueron construidos y cedidos por I. Burgui (Burgui Herrera, 2006).

El plásmido pChStaufen-1 fue construido y cedido por P. Villacé (Villacé et al., 2004)

### 5.- ANTICUERPOS

#### 5.1.- Anticuerpos primarios

El suero policlonal de rata anti NP se generó por hiperinmunización de ratas con la proteína His-NP purificada en bacteria y fue cedido por I. Salanueva.

El anticuerpo monoclonal E10 está dirigido frente a un epítipo amino-terminal común para las proteínas M1 y M2. Fue cedido por A. García-Sastre (Bourmakina and Garcia-Sastre, 2005; Salvatore et al., 2002).

Las caracterizaciones de los anticuerpos monoclonales contra las proteínas PA y PB2 han sido descritas previamente (Barcena et al., 1994; Ochoa et al., 1995). El suero policlonal de conejo anti PB1 se obtuvo por inmunización de conejos con proteína PB1 purificada (González and Ortin, 1999b).

Para la detección de eIF4GI se utilizó una mezcla de anticuerpos policlonales de conejo obtenidos por inmunización de péptidos del N-terminal y el C-terminal de eIF4GI (Aragón et al., 2000).

Los anticuerpos monoclonales anti RNAP II (8WG16, H5 y H14) fueron adquiridos

a Covance. Estos tres anticuerpos reconocen diferentes formas de fosforilación del dominio carboxilo terminal (CTD) de la subunidad mayor de la RNAP II. El anticuerpo 8WG16 reconoce la forma defosforilada en Serina 2, el anticuerpo H5 reconoce la forma fosforilada en Serina 2 y el anticuerpo H14 reconoce la forma fosforilada en Serina 5.

El anticuerpo policlonal de conejo N-20, que reconoce el extremo amino-terminal de la subunidad mayor de la RNAP II, el anticuerpo policlonal de cabra anti ciclina T1, el anticuerpo monoclonal anti la kinasa dependiente de ciclina 7 (Cdk7) y el anticuerpo policlonal de conejo anti ubiquitina fueron adquiridos a Santa Cruz. El anticuerpo policlonal de conejo C14orf166 (hCLE) se adquirió a Abcam.

El anticuerpo monoclonal contra  $\beta$ -Tubulina se adquirió a Sigma.

El anticuerpo monoclonal que reconoce el epítipo de hemaglutinina (HA) se adquirió de Covance.

El suero de conejo #389 (y su preinmune, #763) contra la proteína hCLE fue generado por M. Huarte y su caracterización ha sido descrita anteriormente (Huarte et al., 2001).

### 5.2.- Anticuerpos secundarios

Los anticuerpos secundarios usados para WB se obtuvieron de Sigma y fueron:

- ✓ Cabra anti conejo unido a peroxidasa de rábano.
- ✓ Conejo anti rata unido a peroxidasa de rábano.
- ✓ Cabra anti ratón unido a peroxidasa de rábano.

## 6.- REACTIVOS Y DROGAS

Los compuestos químicos ortovanadato de sodio, glicerofosfato y molibdato de sodio, que se utilizaron como inhibidores de fosfatasas fueron suministrados por ICN. El inhibidor de proteasas Complete se adquirió a Roche. La  $\alpha$ -amanitina, el inhibidor del proteasoma MG-132, la puromicina utilizada en la selección y mantenimiento de líneas celulares estables y el inhibidor de la replicación del virus Vaccinia Citosina  $\beta$ -D-Arabinofuranósido (AraC) se obtuvieron de Sigma.

## MÉTODOS

### 7. MANIPULACIÓN DE DNA Y CLONAJES

#### 7.1.- Plásmidos de silenciamiento

##### 7.1.1.- pSUPER-hCLE 121-143, pSUPER-hCLE 417-435, pSUPER-hCLE 624-642 y pSUPER-TM

Para obtener los plásmidos que permiten el silenciamiento génico de hCLE se hibridaron oligos parcialmente complementarios (hCLE 121-143 y hCLE 143-121, hCLE 417-435 y hCLE 435-417 o hCLE 624-642 y hCLE 642-624) y posteriormente se clonaron en el plásmido pSUPER digerido con las enzimas BglII y HindIII. Los siRNAs que expresan estos plásmidos comprenden los nucleótidos del 121 al 143, 417 al 435 y 624 al 642 del mRNA de hCLE respectivamente y fueron diseñados utilizando el programa informático de predicción de siRNAs de la casa Oligoengine.

El plásmido pSUPER-TM, que sirve de

Oligos	Secuencia
hCLE 121-143	5'GATCCCC <b>AAGATTGAAGACAGAGGGAATTTT</b> CAA GAGAAA <b>ATTCCTCTGTCTTCAATCTTTT</b> TGGAAA 3'
hCLE 143-121	5'AGCTTTTCCAAAA <b>AAGATTGAAGACAGAGGGAAT</b> TTTCTCTTGAAA <b>ATTCCTCTGTCTTCAATCTT</b> GGG 3'
hCLE 417-435	5'GATCCCC <b>CTGCTTCAGATTACGCGTTT</b> CAAG AGA <b>ACGCTGAATCTGAAGCAGGTTT</b> TGGAAA 3'
hCLE 435-417	5'AGCTTTTCCAAAA <b>CTGCTTCAGATTACGCG</b> TTCTCTTGAA <b>ACGCTGAATCTGAAGCAGG</b> GGG 3''
hCLE 624-642	5'GATCCCC <b>CATAGAGGAGCTCAGAGAGTT</b> CAAG AGA <b>CTCTCTGAGCTCCTCTATGTTT</b> TGGAAA 3'
hCLE 642-624	5'AGCTTTTCCAAAA <b>CATAGAGGAGCTCAGAGA</b> GTCTCTTGA <b>ACTCTCTGAGCTCCTCTAT</b> GGGG 3'
TM_Sense	5'GATCCCC <b>AATTCTCCGAACGTGTCACGTTT</b> CAA GAGA <b>ACGTGACACGTTCCGAGAATA</b> TTTTTGGAAA 3'
TM_Antisense	5'AGCTTTTCCAAAA <b>TATTCTCCGAACGTGTCACG</b> TTCTCTTGA <b>ACGTGACACGTTCCGAGAATT</b> GGG 3'

**Tabla III.** Oligonucleótidos utilizados en la construcción de los plásmidos de silenciamiento génico. En negrita se muestran las secuencias correspondientes a los siRNAs.

control de silenciamiento, expresa un siRNA correspondientes a la sección 21/136 del genoma de la bacteria *Thermotoga maritima*. La secuencia de este siRNA no híbrida con ningún gen de mamífero conocido. Para obtener este plásmido se hibridaron los oligos parcialmente complementarios TM-sense y TM-antisense y posteriormente se ligaron en el plásmido pSUPER digerido con las enzimas BglII y HindIII.

### 7.1.2.- pSR-PURO-hCLE 121-143 y pSR-PURO-TM

El plásmido pSR-PURO-hCLE 121-143 se obtuvo de la misma forma que el plásmido pSUPER-hCLE 121-143 pero clonando los oligos hibridados en el plásmido pSR-PURO.

De igual forma se obtuvo el plásmido pSR-PURO-TM.

## 8.- MANIPULACIÓN DE CULTIVOS CELULARES

### 8.1.- Mantenimiento de cultivos celulares

Las líneas celulares COS-1, HeLa y NLB2 se cultivaron en Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) suplementado con aminoácidos no esenciales y suero fetal bovino (FBS) al 5%, según un protocolo descrito con anterioridad (Ortín et al., 1980). Las líneas celulares HEK-293T, DF-1, NIH-3T3 y A549 se cultivaron en el mismo medio con FBS al 10%. Las células HEK-293T, se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% FBS, pero utilizando tripsina-EDTA al 10% en PBS. Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37° C y con 5% de CO<sub>2</sub>.

### 8.2.- Transfecciones

Las transfecciones de cultivos subconfluentes de células HEK-293T se

llevaron a cabo utilizando el método del fosfato cálcico (Graham and van der Eb, 1973; Wigler et al., 1979). Las placas de cultivo o los cubreobjetos donde se cultivaron estas células fueron tratados durante 30 min a 37°C con poli-L-lisina (Sigma) a 0.1mg/ml, y posteriormente lavados dos veces con PBS antes de entrar en contacto con las células. Se transfectaron 4µg de DNA por 1.25x10<sup>6</sup> células.

### 8.3.- Infecciones

Las infecciones de células con los diferentes virus de la gripe se realizaron a una multiplicidad de infección (moi) entre 1 y 5 (alta multiplicidad) unidades formadoras de placa por célula (pfu/célula) o a 10<sup>-3</sup> (baja multiplicidad), según se indique en cada experimento. Todas las infecciones se realizaron sobre monocapas de células en una confluencia en torno al 100% y subcultivadas el día anterior. Los inóculos de virus se prepararon en tampón PBS completo (PBSc) suplementado con 5µg/ml de seroalbúmina bovina (BSA). Se retiró el medio de cultivo de las células, se realizaron dos lavados con PBSc y se añadió el inóculo viral. Se mantuvo el inóculo durante 1 hora a temperatura ambiente (RT) para que tuviera lugar la adsorción del virus. Tras la hora de incubación se retiró el inóculo de virus, se lavaron las células 2 veces con PBSc y se incubaron con DMEM libre de suero durante el tiempo y a la temperatura indicados en cada experimento.

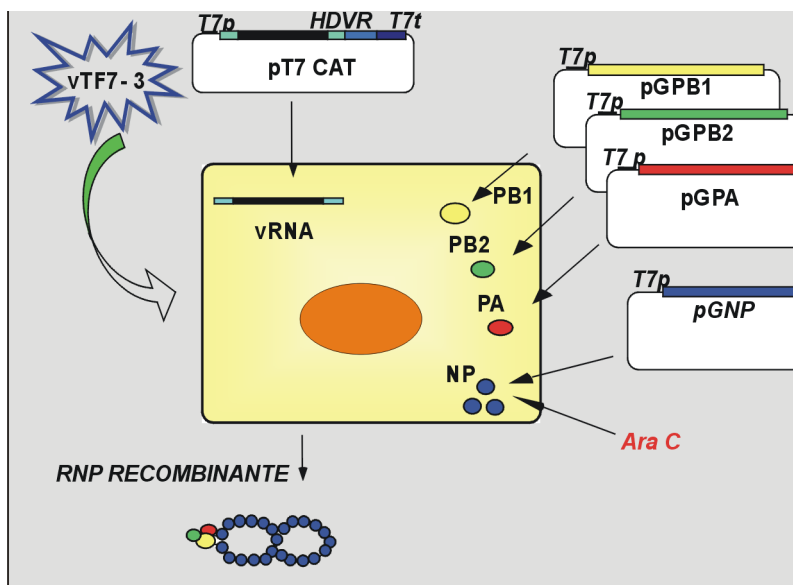
### 8.4.- Aislamiento de núcleos

Los núcleos de células HEK-293T que posteriormente fueron utilizados para ensayos de síntesis de RNA *in vitro*

(explicado en el apartado 10.1) se aislaron según una adaptación de un protocolo anterior (Sambrook, 1989). Todo el proceso fue llevado a cabo en frío y las cantidades se refieren a 1.25x10<sup>6</sup> células. Las placas de cultivo se pusieron en hielo, se retiró el medio y se recogieron las células en PBS a 4°C. Las células se centrifugaron a 1200 rpm a 4°C durante 5 min y se lavaron dos veces con 1ml de PBS frío, repitiendo la centrifugación de la misma manera. Las células lavadas y centrifugadas se incubaron durante 15 min en hielo en 400µl de tampón de lisis (10mM Tris-HCl pH 7.4, 10mM NaCl, 3mM MgCl<sub>2</sub> y 0.1% NP-40), agitando ocasionalmente. Tras la lisis, las células se centrifugaron como anteriormente y se descartó la fracción citosólica soluble. La fracción restante son los núcleos, que se resuspendieron en 20µl de tampón de congelación (50mM Tris-HCl pH 8.3, 40% glicerol, 5mM MgCl<sub>2</sub> y 0.1mM EDTA) y se congelaron rápidamente en N<sub>2</sub> líquido, para después guardarse a -80°C hasta el momento de su utilización.

### 8.5.- Reconstitución de RNPs *in vivo*

La reconstitución de ribonucleoproteínas (RNPs) del virus de la gripe se hizo siguiendo el protocolo anteriormente descrito (Mena et al., 1994; Mena et al., 1996). Brevemente, y tal y como se muestra en la **Figura 11**, monocapas de células HEK-293T en placas de 35mm, se infectaron con el virus Vaccinia recombinante vTF7-3 a una moi de 5 pfu/célula. Tras 1 hora de adsorción del virus a 37°C, el cultivo se lavó 2 veces con PBSc y se agregó DMEM suplementado con 10% FBS y 50µg/ml de AraC, un inhibidor de la replicación y la expresión de genes tardíos del virus Vaccinia (Kaverin et al.,



**Figura 11. Reconstitución de RNPs.** Cultivos de células HEK-293T infectadas con el virus recombinante Vaccinia vTF7-3 que expresa constitutivamente la polimerasa del fago T7 fueron transfectados con los plásmidos que expresan, bajo el promotor de T7, la polimerasa viral, NP y un RNA molde, que tras su autoprosesamiento por la ribozima del virus de la hepatitis Delta, genera un pseudo RNA con el gen marcador *cat*. Se analizó la acumulación de la proteína CAT como una medida de la actividad de las RNPs reconstituídas.

1975). Posteriormente se cotransfectó el cultivo con una mezcla de plásmidos que contenía: pGEM-PB1 (500ng), pGEM-PB2 (500ng), pGEM-PA (100ng), pGEM-NP (2μg) y pT7NSCAT-RT (2μg). La mezcla de plásmidos se transfectó mediante el método del fosfato cálcico (Graham and van der Eb, 1973; Wigler et al., 1979).

#### 8.6.- Generación de líneas celulares estables

Monocapas de células HEK-293T en placas de 35mm se transfectaron con 2μg del plásmido de silenciamiento pSR-PURO-hCLE 121-143 o el plásmido control pSR-PURO-TM. Al día siguiente el cultivo se lavó 2 veces con PBS y se agregó DMEM suplementado con 5% FBS y 2μg/ml de puomicina para proceder a la selección. Cada 2 o 3 días se fue cambiando el medio de selección por DMEM 10% FBS y 2μg/ml de puomicina. Cuando se tuvo una

cantidad suficiente de células, alícuotas de las mismas se congelaron en nitrógeno líquido o se utilizaron para analizar el grado de silenciamiento obtenido por Western blot anti hCLE.

### 9.- TÉCNICAS VIROLÓGICAS

#### 9.1.- Generación de stocks de trabajo

Se infectaron monocapas de células MDCK a baja moi ( $10^{-3}$  pfu/célula). Tras 36-40 horas de incubación a 37°C y cuando el efecto citopático observado alcanzaba el 50% de la monocapa, se recogieron los sobrenadantes. Se centrifugaron durante 5 min a 4° C y 1500 rpm, los sobrenadantes se recogieron y se guardaron congelados a -80° C.

#### 9.2.- Titulación de virus mediante ensayo de placa

Se infectaron monocapas de células MDCK con diluciones decimales seriadas de virus preparadas en tampón PBSc suplementado con 5 µg/ml BSA y se incubaron durante aproximadamente 72 h a 37°C en un medio semisólido que contenía DMEM, 0.7% agar, 1% DEAE-dextrano y 2.5µg/ml de tripsina. Cuando las placas de virus resultaron visibles, las células se fijaron con 10% formaldehído, se tiñeron con una solución de cristal violeta y se hizo un recuento de las placas.

### 9.3.- Curvas de crecimiento

Se infectaron monocapas de células HEK-293T, a la multiplicidad especificada en cada experimento y se tomaron alícuotas del sobrenadante a distintos tiempos post-infección. Posteriormente, se analizó la infectividad de dichos sobrenadantes realizandolas correspondientes titulaciones tal y como se indica en el apartado 9.2 de Materiales y Métodos.

En los experimentos a baja multiplicidad de infección con la cepa VIC dicho medió se suplementó con 2.5µg/ml de tripsina.

En los experimentos para determinar la generación de partículas infecciosas a alta multiplicidad, después de retirar el inóculo tras la hora de adsorción, se realizó un primer lavado de las células con PBSc pH 5.3 con el fin de eliminar las partículas virales que no se han adsorbido.

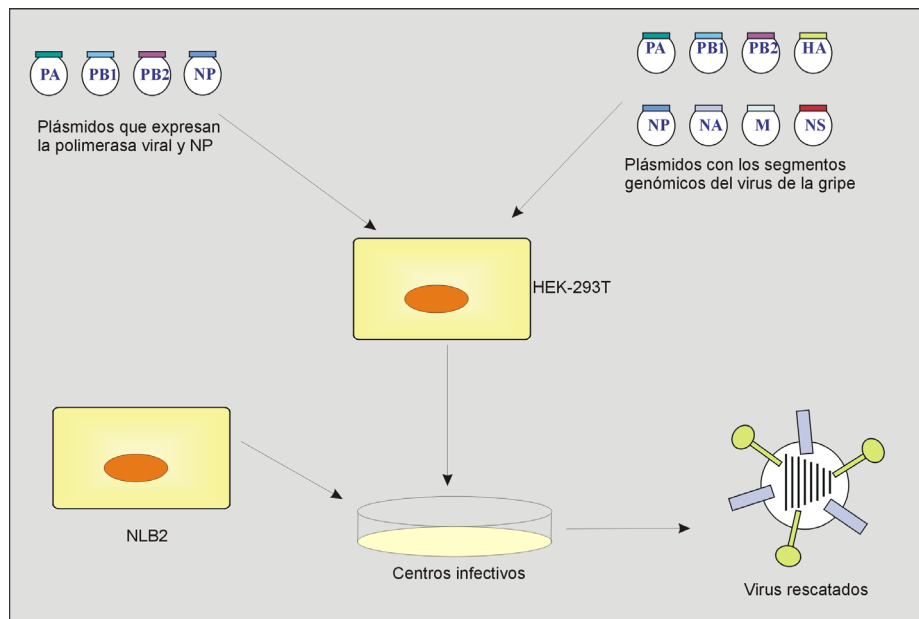
### 9.4.- Inmunomicroscopia electrónica de células infectadas

Se infectaron o mock infectaron monocapas de células HEK-293T con virus VIC a alta moi (1 pfu/célula). A las 8 hpi, se lavaron las células y se les añadió una solución fijadora compuesta por una mezcla de 4% paraformaldehído y 0.1%

Glutaraldehído en PBS. Se mantuvieron con dicha solución fijadora durante 30 min a 4°C, tras la cual se recogieron las células y se centrifugaron 5 min a 4°C y 1500 rpm. Se eliminó la solución fijadora y se dejaron las células en 1 ml de PBS. Posteriormente se procedió a realizar la crioprotección de las muestras, para lo cual se las trató con glicerol 30% durante 30 min a RT. Después de eliminar el glicerol se procedió a la vitrificación introduciendo las muestras en etanol líquido a -175°C. Seguidamente se realizó la criosustitución para lo cual se incubaron las muestras con una solución de metanol y 0.5% de acetato de uranilo durante 55 h a -90°C. Después de lavar con metanol puro a -40°C, las muestras se infiltraron en resina HM20 a -40°C durante 20 h, tras lo cual se realizó la polimerización con luz ultravioleta durante 36 h a -40°C seguido de una incubación de 48 h a RT. Las muestras polimerizadas se cortaron con un ultramicrotomo en secciones ultrafinas de aproximadamente 60nm que se recogieron sobre rejillas de oro recubiertas con Formvar y carbón. Las rejillas se contrastaron durante 20 min con acetato de uranilo saturado.

Posteriormente, las rejillas se preadsorbieron y bloquearon en TBS con 1.5% de BSA y 0.2% de Tween-20 durante 30 min a RT. Luego se incubaron durante 1 hora a RT con el anticuerpo de conejo anti hCLE #389 (o su preinmune, #763) diluidos 1:10 en TBS 1.5 BSA. Se lavaron las rejillas 4 veces con TBS 1.5% BSA y 0.2% Tween-20 y se volvió a bloquear durante 15 min a RT antes de incubar durante 45 min a RT con el anticuerpo secundario (cabra anti conejo IgG Fab<sub>2</sub> conjugado con oro coloidal de 10nm) diluido 1:40 en TBS 1.5% BSA. Después de





**Figura 12. Rescate de virus recombinantes.** La co-transfección de los ocho plásmidos que codifican los segmentos virales junto con los plásmidos de expresión de la polimerasa viral y NP da lugar a la formación de las ocho RNPs virales, que al replicar y transcribir darán lugar a todos los productos virales necesarios para la obtención de una progenie viral. Los virus producidos son posteriormente amplificados en células productivas (NLB2) mediante centros infecciosos.

lavar las rejillas con TBS 0.2% Tween-20 y posteriormente con agua destilada, se secaron y contrastaron. Finalmente, las muestras se estudiaron en un microscopio electrónico JEOL 1011 a una potencia de 100 KV y las imágenes se adquirieron en películas KODAK SO-163.

### 9.5.- Rescate de virus recombinantes

Se utilizó el protocolo descrito (Neumann et al., 1999) tal y como se resume en la **Figura 12**. Brevemente, se co-transfectaron células HEK-293T con la mezcla de plásmidos que expresan los vRNAs genómicos de acuerdo al virus a rescatar. Junto con estas mezclas se co-transfectaron los plásmidos pCMV-PB1, -PB2, -PA y -NP que dan lugar a la expresión de las tres subunidades de la polimerasa viral y NP. La transfección se realizó por el método del fosfato cálcico (Wigler et al., 1979). A las 16 hpi se

tripsinizaron las células transfectadas y se cultivaron junto con un exceso de células MDCK en medio DMEM sin suero. Cuando el efecto citopático fue de alrededor de un 50%, se recogió el sobrenadante, que se tituló como se describe en el apartado 9.2 de Materiales y Métodos. Finalmente se prepararon *stocks* de trabajo de los respectivos virus recombinantes según se indica en el apartado 9.1 de Materiales y Métodos.

## 10.- MANIPULACIÓN DE RNA

### 10.1.- Síntesis de RNA *in vitro* en núcleos aislados

Para llevar a cabo la síntesis de RNA *in vitro*, se aislaron los núcleos de células HEK-293T como se indica en el apartado 8.4 y la síntesis se realizó siguiendo una adaptación de un protocolo descrito



anteriormente (Sambrook, 1989). Este ensayo lo utilizamos para medir la actividad de la RNAP II en distintas condiciones experimentales. Para poder distinguir la marca de síntesis debida a la RNAP II de la debida a las RNAP I y RNAP III, la síntesis se realizó en paralelo en presencia y ausencia de la droga  $\alpha$ -amanitina a una concentración de 5 $\mu$ g/ml, que es suficiente para inhibir a la RNAP II pero no a la RNAP III (la RNAP I es insensible a este inhibidor). Así, la síntesis de RNA debida a la actividad de la RNAP II vendrá dada como la diferencia entre la marca medida en las muestras sin tratar con  $\alpha$ -amanitina (RNAP I+II+III) y la marca de las muestras tratadas con la droga (RNAP I+III).

Los núcleos se descongelaron en hielo y se les añadió un volumen de tampón de transcripción sin nucleótidos: 10mM Tris-HCl pH 8, 5mM MgCl<sub>2</sub> y 0.3M KCl, suplementado en el momento con 5mM DTT y  $\alpha$ -amanitina 5 $\mu$ g/ml concentración final, en las muestras que lo requirieran. Los núcleos se preincubaron 5 min a 30°C y se les añadió la mezcla de nucleótidos de manera que sus concentraciones finales fueron 0.5mM ATP, 0.5mM CTP, 0.5mM UTP, 0.01 mM GTP y 2.25mM [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]GTP (400Ci/mmol, 10mCi/ml), tras lo cual se incubaron 10 min a 30°C. Pasado el pulso de síntesis, los núcleos se trataron con 40 $\mu$ g/ml DNasa I en tampón HB durante 30 min a 30°C y con 40 $\mu$ g/ml proteinasa K en TNE (100mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 5mM EDTA) con 0.4% SDS durante 30 min a 42°C. Las muestras se fenolizaron y el RNA se precipitó con etanol. Posteriormente, el RNA se analizó por electroforesis en geles de agarosa en MOPS (20mM MOPS *sodium salt* pH 7, 5mM acetato sódico y 0.5mM EDTA) con

4% formaldehído y 1 $\mu$ g/ml bromuro de etidio. Finalmente, los geles se transfirieron a membranas de naylon Biodyne® (Pall Corporation) y la radiactividad se cuantificó en un Phosphorimager utilizando el programa ImageQuant

## 10.2.- Aislamiento de RNA total celular para análisis por Northern blot

El RNA total de células HEK-293T, infectadas o sin infectar, se aisló con ULTRASPEC™ RNA Isolation Reagent (Biotechx) siguiendo las indicaciones del fabricante.

## 10.3.- Detección y cuantificación de RNAs virales por Northern blot

El RNA total celular procedente de células HEK-293T, infectadas o no, se separó en geles de MOPS 1.5% agarosa con 4% formaldehído y 1 $\mu$ g/ml bromuro de etidio y se transfirió a membranas de naylon Biodyne® (Pall Corporation) en condiciones estándar (Sambrook, 1989). Las membranas se prehibridaron 2 h a 37°C con una solución 6X SSC, 5X Denhards, 0.5% SDS, 40% formamida, 50 $\mu$ g/ml DNA esperma de salmón sonificado y 100 $\mu$ g/ml RNA levadura y posteriormente se hibridaron 16 h a RT en la misma solución a la que se añadió la sonda específica marcada radiactivamente como se detalla en el apartado 11.1 a una concentración de 10<sup>6</sup> cpm/ml. Tras la hibridación, las membranas se lavaron 15 min a 37°C con una solución 6X SSC y 0.5% SDS con agitación, posteriormente se realizó otro lavado de 10 min a 37°C con 4X SSC y 0.3% SDS, y se expusieron a pantallas de detección en Phosphorimager y la radiactividad detectada se cuantificó con el programa ImageQuant.

### 10.4.- Detección y cuantificación de mRNAs celulares por *Dot blot*

Para analizar la síntesis de mRNAs celulares de genes específicos, 0,5 µg de los cDNAs de hStaufen-1, β-Tubulina y Vimentina, obtenidos por digestión y purificación a partir de los plásmidos pChStaufen-1, pGEM-β-Tubulina y pGEM-Vimentina respectivamente, se fijaron en un filtro de nylon y se hibridaron utilizando como sonda los RNAs sintetizados *in vitro* en núcleos aislados de células infectadas o sin infectar como se indica en el apartado 10.1. Las membranas se prehibridaron 2 h a 65°C con una solución 5X SSC, 5mM EDTA, 0.2% SDS y 100µg/ml RNA levadura y posteriormente se hibridaron 16h a 37°C con la sonda previamente desnaturalizada a 100°C durante 3 min. Al día siguiente se recuperó la sonda no hibridada y se lavaron las membranas durante 20 min a RT con 2XSSC y 0.1% SDS. Una vez alcanzada la relación señal/ruido deseada, la marca obtenida fue cuantificada con el programa ImageQuant.

### 11.- PREPARACIÓN DE SONDAS PARA HIBRIDACIÓN

#### 11.1.- Sondas de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados como sonda se marcaron radiactivamente en el extremo 5' con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP mediante incubación durante 30 min a 37°C con la enzima T4 Polinucleótido Kinasa (PNK Kinasa). Luego se fenolizaron y purificaron a través de columnas de Sephadex G25-80 (Sigma) saturadas con 100µg de RNA de levadura. Posteriormente se confirmó la incorporación de la marca en los oligos

Oligos	Secuencia
NP positivo	5'TCTTAGGATCTTTCCCCGC 3'
NP negativo	5'GTCTTCGAGCTCTCGGAC 3'

**Tabla IV.** Oligos utilizados para la detección de los RNAs virales del segmento 5 producidos durante la infección.

por electroforesis en geles de acrilamida (4%) 6M urea. Finalmente, las sondas se hibridaron a una concentración aproximada de 10<sup>6</sup> cpm/ml en las condiciones que se detallan en el apartado 10.3.

### 12.- ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

#### 12.1.- Marcaje metabólico *in vivo* de proteínas virales

El marcaje *in vivo* de proteínas virales se llevó a cabo según el protocolo previamente descrito (Zurcher et al., 2000). Brevemente, las células se infectaron y a distintos tiempos post-infección se lavaron y mantuvieron durante 30 min en medio DMEM carente de los aminoácidos metionina y cisteína. A continuación, se incubaron durante 1h con el mismo medio suplementado con <sup>35</sup>S-Met/Cys (50µCi/ml). Tras el marcaje, se recogieron los extractos totales en tampón Laemmli y se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida y autoradiografía.

#### 12.2.- Determinación vida media de la RNAP II

Las células se deplecionaron durante 2 h en DMEM carente de metionina y cisteína. Posteriormente se marcaron durante 1 h con DMEM suplementado con <sup>35</sup>S-Met/Cys (100µCi/ml). La caza se realizó mediante

extensivo lavado con DMEM y posterior incubación en DMEM suplementado con 10% FBS. Finalmente, a distintos tiempos las células se lavaron con PBS con inhibidores de proteasas y fosfatasa y el pellet se resuspendieron en tampón de lisis (1X TNE, 50mM NaCl, 0.5% CA630, complete) para su posterior utilización en ensayos de inmunoprecipitación como se describe en el apartado 12.3.

### 12.3.- Inmunoprecipitación de proteínas

Los ensayos de inmunoprecipitación se realizaron según el protocolo previamente descrito (Lutz et al., 2006). Brevemente, los extractos celulares se resuspendieron en tampón de lisis (1X TNE, 50mM NaCl, 0.5% CA630, complete y Benzodanasa en caso de ser necesario) y se incubaron con los anticuerpos correspondientes durante 2 h a 4°C en agitación. Por otra parte, en los casos donde se utilizaron anticuerpos monoclonales para la inmunoprecipitación, se incubó la resina de proteína A-Sepharosa con anticuerpo de conejo anti ratón (RAM por *rabbit anti mouse*). Finalmente, se incubaron los extractos con la resina durante 4 h a 4°C con agitación. Después de lavar extensivamente con el tampón 10mM Tris-Cl, pH 8, 100mM NaCl, 0.5% Triton X100, 0.5mM DTT, 0.2mM EDTA, el material unido se eluyó hirviendo la matriz en tampón Laemmli y las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida seguido de *western blot* o autoradiografía, según corresponda.

### 12.4.- Western blot

Los extractos celulares se recogieron en tampón *Laemmli* y las proteínas se separaron por electroforesis en geles de

SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) y se transfirieron a membranas de Immobilon (Milipore), las cuales, previo a su incubación con los anticuerpos primarios, se saturaron en una solución de 3% BSA o 5% leche desnatada en PBS durante 2 h a RT. Tras una incubación de 1 h a RT con los anticuerpos primarios correspondientes (**Tabla V**), las membranas se lavaron repetidas veces con PBS 0.25% Tween-20. Luego se incubaron 1 h a RT con los anticuerpos secundarios correspondientes, conjugados a peroxidasa. Tras realizar mas lavados con PBS 0.25% Tween-20, las membranas se revelaron por quimioluminiscencia.

Anticuerpo	Naturaleza	Origen	Carácter	Dilución
$\alpha$ -PB1	Policlonal	Conejo	Primario	1:1000
$\alpha$ -PB2 (#8, #28)	Monoclonal	Ratón	Primario	1:100 cada uno
$\alpha$ -PA (#2, #9, #14)	Monoclonal	Ratón	Primario	1:200 cada uno
$\alpha$ -NP	Policlonal	Rata	Primario	1:2000
$\alpha$ -M1/M2	Monoclonal	Ratón	Primario	1:200
$\alpha$ -RNAP II (8WG16)	Monoclonal	Ratón	Primario	1:500
$\alpha$ -RNAP II (H5)	Monoclonal	Ratón	Primario	1:500
$\alpha$ -RNAP II (H14)	Monoclonal	Ratón	Primario	1:500
$\alpha$ -RNAP II (N-20)	Policlonal	Conejo	Primario	1:500
$\alpha$ -eIF4G (#504-507)	Policlonal	Conejo	Primario	1:4000 cada uno
$\alpha$ -Ciclina T1	Policlonal	Cabra	Primario	1:1000
$\alpha$ -cdk7	Monoclona	Ratón	Primario	1:1000
$\alpha$ - $\beta$ -Tubulina	Monoclona	Ratón	Primario	1:15000
$\alpha$ -Ubiquitina	Policlonal	Conejo	Primario	1:1000
$\alpha$ -HA	Monoclona	Ratón	Primario	1:3000
$\alpha$ -hCLE (#763)	Policlonal	Conejo	Primario	1:1000
$\alpha$ -C14orf166 (hCLE)	Policlonal	Conejo	Primario	1:1000
Cabra $\alpha$ -conejo	Policlonal	Cabra	Secundario	1:20000
Cabra $\alpha$ -ratón	Policlonal	Cabra	Secundario	1:3000
Conejo $\alpha$ -rata	Policlonal	Conejo	Secundario	1:10000

**Tabla V.** Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la detección de proteínas por *Western blot*. Se indica el origen del anticuerpo y la dilución a la que se han utilizado.









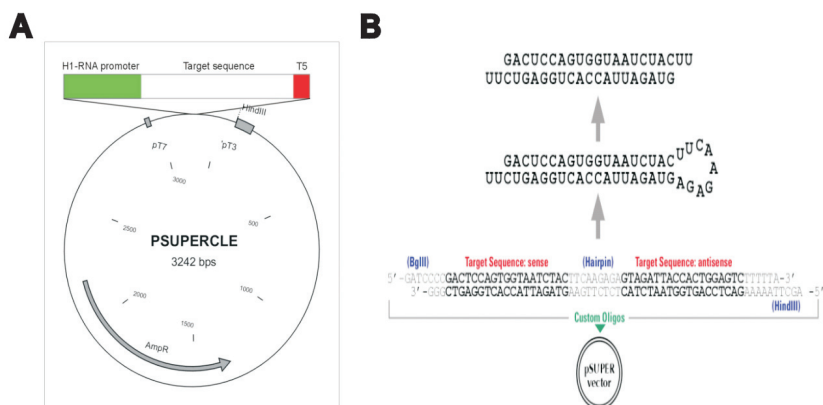


## RESULTADOS

### 1.1.- Optimización del silenciamiento de hCLE

Para comenzar a estudiar la funcionalidad de hCLE en el ciclo viral se decidió silenciar dicha proteína. Para ello se utilizó el plásmido pSUPER (**Figura 13 A**) o su derivado pSUPER-Retro-Puro, los cuales expresan a partir de un promotor de polimerasa III pequeños transcritos de RNA sin poliA, cuyos extremos se parecen a los siRNA sintéticos. Estos transcritos se pliegan sobre sí mismos formando una estructura con 19nt hibridados y una horquilla. Cuando esta horquilla es procesada por la enzima DICER, se obtienen siRNAs específicos para el gen deseado (**Figura 13 B**).

Para poder estudiar el efecto que produce la disminución de hCLE durante la infección, se diseñaron y clonaron en el vector pSUPER, las distintas secuencias dirigidas contra el RNA mensajero de hCLE (hCLE 121-143, 417-435 y 624-642) así como la secuencia que sirve de control (TM) al ser derivada de la bacteria *Thermotoga maritima* y no hibridar con ningún gen de mamífero conocido. Primero se analizó

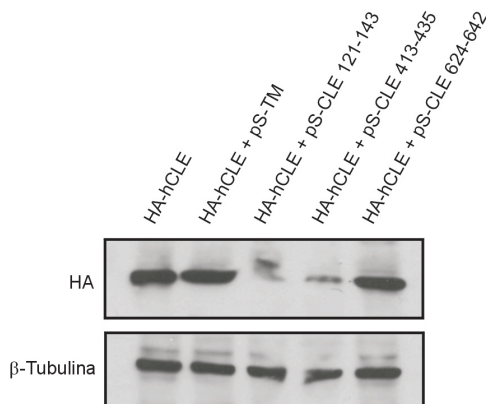


**A.** Mapa del plásmido pSUPER en el que se muestra en verde el promotor H1 y en rojo el terminador. **B.** Esquema que muestra la generación de los siRNAs.

la capacidad de silenciamiento de cada una de las secuencias específicas para el gen hCLE. Para esto, y debido a que en el momento de realizar estos experimentos no se disponía de un anticuerpo capaz de detectar la proteína en extractos celulares totales, se decidió analizar el silenciamiento sobre la proteína HA-hCLE al sobreexpresarla en células HEK-293T por co-transfección de 1 $\mu$ g del plásmido pCDNA-HA-hCLE con 1 $\mu$ g de cada uno de los plásmidos de silenciamiento. Como se puede ver en la **Figura 14**, tomando como referencia la acumulación de la proteína control  $\beta$ -Tubulina, la secuencia TM no produce ninguna disminución en la cantidad de HA-hCLE que se acumula 48hs post-transfección, mientras que las secuencias específicas contra el RNA mensajero de hCLE si lo hacen, especialmente las dirigidas contra los nucleótidos 121 a 143 y 417 a 435.

El silenciamiento obtenido con las secuencias 121-143 y 417-435 es similar. Se decidió continuar con la secuencia hCLE 121-143 ya que uno de los requisitos recomendados por la empresa Oligoengine para obtener un buen silenciamiento es que la secuencia contra la que se diseña el siRNA esté a más de 100nt pero lo más cercano posible del extremo 5' del mRNA.

Una vez seleccionada la secuencia a utilizar en el resto de experimentos, se realizó una cinética para determinar el tiempo en el que se obtiene el mayor silenciamiento. Para esto, nuevamente se co-transfectaron células HEK-293T con el plásmido pCDNA-HA-hCLE y el plásmido pSUPER-hCLE 121-143 o su control pSUPER-TM y a distintos tiempos post-transfección se analizó la acumulación



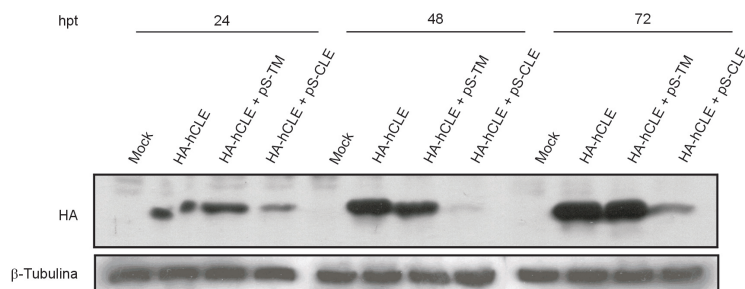
**Figura 14. Análisis del silenciamiento producido por las distintas secuencias específicas de hCLE.**

Se co-transfectaron células HEK-293T con el plásmido pCDNA-HA-hCLE y los plásmidos de silenciamiento pSUPER-hCLE 121-143, 417-435 y 624-642 o el plásmido control pSUPER-TM. A las 48hs se recogieron las células y se analizó la acumulación de las proteínas HA-hCLE y  $\beta$ -Tubulina por Western blot.

de las proteínas HA-hCLE y  $\beta$ -Tubulina. Como se observa en la **Figura 15**, hay un aumento del silenciamiento de HA-hCLE a 48hs al compararlo con el punto de 24hs, mientras que a 72hs hay una recuperación en la acumulación de la proteína HA-hCLE. Debido a esto, se eligió el tiempo 48hs como el óptimo para analizar el efecto del silenciamiento de hCLE sobre la infección viral.

## 1.2.- Análisis del efecto de la disminución de hCLE en la actividad de RNPs recombinantes

Una vez determinadas las condiciones de silenciamiento, se procedió a analizar el efecto que la disminución de hCLE tiene sobre el virus de la gripe. Se decidió comenzar este estudio analizando la actividad de las RNPs virales reconstituídas *in vivo* como medida de la actividad de la polimerasa viral. Este sistema consiste en la co-transfección de los plásmidos que



**Figura 15. Análisis del silenciamiento de HA-hCLE a distintos tiempos.**

Se co-transfectaron células HEK-293T con el plásmido pCDNA-HA-hCLE y el plásmido de silenciamiento pSUPER-hCLE 121-143 o el plásmido control pSUPER-TM. A distintos tiempos post-transfección se recogieron extractos celulares y se analizó la acumulación de las proteínas HA-hCLE y β-Tubulina por *Western blot*.

expresan la polimerasa viral y NP junto con un plásmido que da lugar al RNA molde (**Figura 11** de Materiales y Métodos). De esta forma se establece un sistema de transcripción-replicación viral transitorio que permite estudiar la expresión génica viral sin tener en cuenta otros procesos que tienen lugar durante la infección. Por lo tanto, permite trabajar en un sistema experimental más sencillo que la infección *per se*, pero reflejando la actividad de la polimerasa en el sistema de infección.

El silenciamiento de hCLE produce una disminución de aproximadamente el 50% en la síntesis de transcritos producidos por la RNAP II (Pérez-González et al., 2006), por lo que se descartó la utilización del sistema de expresión de los componentes de la polimerasa viral y NP bajo un promotor de Pol II debido a la posibilidad de tener efectos del silenciamiento sobre la expresión de los componentes de la RNP. Para superar este inconveniente se eligió el sistema de reconstitución de RNPs en el que los plásmidos de las subunidades de la polimerasa y NP se expresan bajo la RNA polimerasa del fago T7. Este sistema conlleva la infección con un virus Vaccinia que expresa la RNA polimerasa T7 (vTF7-

3) en presencia de AraC, un inhibidor de la replicación y la expresión de genes tardíos del virus Vaccinia (Kaverin et al., 1975), para minimizar los posibles efectos derivados de la utilización del virus. Este sistema ha sido ampliamente utilizado en ensayos de reconstitución de RNPs del virus de la gripe durante muchos años, tanto en nuestro laboratorio como en otros (Bullido et al., 2001; Gómez-Puertas et al., 2000; Mena et al., 1994; Mena et al., 1996; Perales and Ortin, 1997; Perales et al., 2000).

### 1.2.1.- Optimización de los tiempos de transfección de los componentes de la RNP post-silenciamiento de hCLE

Para comenzar se determinó el tiempo óptimo de silenciamiento previo a la reconstitución de RNPs. Para ello, se transfectaron células HEK-293T con 2μg de pSUPER-hCLE 121-143 o pSUPER-TM y a distintos tiempos post-transfección (12, 24 y 36hs), las células se infectaron con el virus vTF7-3 e inmediatamente después se transfectaron con los plásmidos de reconstitución de RNPs y el plásmido que genera el RNA molde pseudoviral de polaridad negativa en las

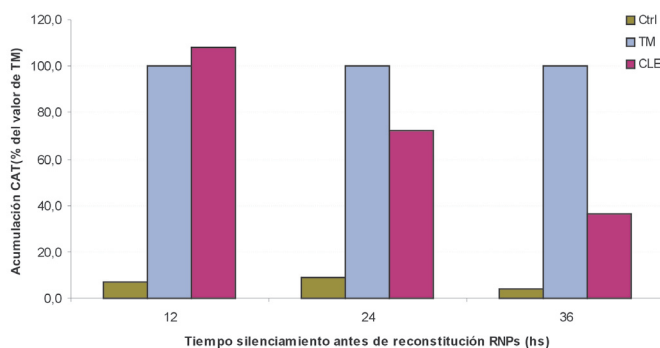
cantidades indicadas en el apartado 8.5 de Materiales y Métodos. Además, a esta mezcla de transfección se le agregó 2µg de pSUPER-hCLE 121-143 o pSUPER-TM según correspondiera, para asegurar que durante todo el tiempo de reconstitución hubiera un silenciamiento óptimo. Por otra parte, se llevó como control negativo una muestra en la que se omitió agregar el plásmido de expresión de PA en la mezcla de transfección. Tras 48hs en presencia de DMEM suplementado con 50µg/ml de AraC, se recogieron los extractos celulares que posteriormente se utilizaron para analizar la actividad de las RNPs reconstituídas a través de la cuantificación, mediante un ensayo de ELISA comercial, de la acumulación de la proteína Cloranfenicol Acetiltransferasa (CAT).

Como se puede observar en la **Figura 16**, en las células transfectadas con la mezcla control en la que se omitió agregar el plásmido de expresión de PA, como era de esperar, prácticamente no se observa acumulación de proteína CAT, mientras

que en las células transfectadas con todos los componentes de la RNP sí se acumuló CAT, lo que confirma que son necesarios todos los componentes de la RNP para tener actividad (de la Luna et al., 1993; Huang et al., 1990; Kimura et al., 1992)). Además, se observó que en condiciones de silenciamiento de hCLE hay una disminución de la actividad de la RNP, obteniendo la mayor disminución cuando la reconstitución se realizó 36hs después del silenciamiento, por lo que los siguientes experimentos se realizaron en estas condiciones.

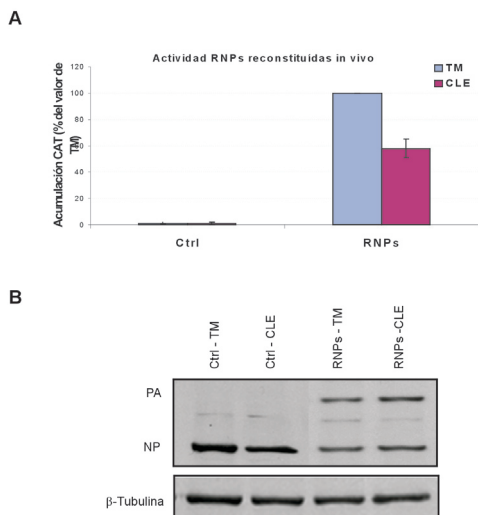
### 1.2.2.- Análisis de la actividad de las RNPs recombinantes durante el silenciamiento de hCLE

Una vez determinadas las condiciones óptimas para la reconstitución de RNPs en células silenciadas, se analizó en experimentos reiterados el efecto que la disminución de la proteína hCLE tiene sobre la actividad de éstas. Para ello se silenciaron células HEK-293T y a las 36hs



**Figura 16. Optimización de las condiciones de reconstitución de RNPs recombinantes en células silenciadas.**

Se transfectaron células HEK-293T con el plásmido de silenciamiento pSUPER-hCLE 121-143 o el plásmido control pSUPER-TM. A distintos tiempos post-transfección las células se infectaron con el virus Vaccinia vTF7-3 y posteriormente se transfectaron con los plásmidos de reconstitución de RNPs, el de silenciamiento o su control según corresponda, y un plásmido codificando el gen CAT en polaridad negativa flanqueado por las regiones no traducidas del segmento NS del virus de la gripe. A las 48hs de reconstitución, se recogieron los extractos celulares y se analizó la acumulación de la proteína CAT. El plásmido expresando PA se omitió en las muestras control.



**Figura 17. Actividad de las RNPs en células silenciadas.**

**A.** Se reconstituyeron RNPs en células silenciadas o sin silenciar. A las 48hs se recogieron los extractos celulares y se determinó la acumulación de la proteína CAT por ELISA. El plásmido expresando PA se omitió en las muestras control. Se muestran la media y las desviaciones estándar de 4 experimentos. **B.** Análisis por *Western blot* de la acumulación de las proteínas componentes de la RNP (PA y NP) y  $\beta$ -Tubulina como control de carga.

se procedió a realizar la reconstitución de RNPs. Además, se agregó nuevamente a la mezcla de transfección el plásmido de silenciamiento o su control, según correspondiera, para asegurar el mantenimiento del silenciamiento durante todo el ensayo.

Como se observa en la **Figura 17 A**, en las muestras control en las que se omitió agregar el plásmido de expresión de PA no se observa acumulación de proteína CAT, independientemente de si las células fueron silenciadas (Ctrl-CLE) o no (Ctrl-TM). Por otro lado, en las células transfectadas con todos los componentes de la RNP si se acumuló proteína CAT, pero la cantidad acumulada, o lo que es lo mismo, la actividad de las RNPs reconstituídas, fue

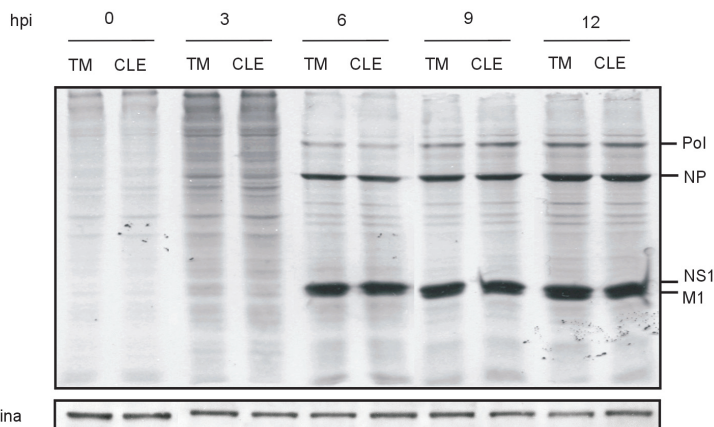
diferente en las células silenciadas (RNP-CLE) o sin silenciar (RNP-TM), siendo casi un 40% menor en condiciones de silenciamiento de la proteína hCLE. Estas acumulaciones de CAT son debidas a la actividad de las RNPs y no a diferencias en la cantidad de RNPs formadas en las células silenciadas y sin silenciar ya que como se observa en la **Figura 17 B**, la acumulación de los componentes de las mismas, analizadas por *Western blot* anti PA y NP, son semejantes en ambos casos. Por tanto, la disminución de la cantidad de hCLE presente en las células disminuye la actividad de las RNPs del virus de la gripe.

### 1.3.- Estudio del efecto que el silenciamiento de hCLE tiene en la infección por el virus de la gripe

En vista de los resultados obtenidos al reconstituir RNPs en células con hCLE silenciado, se decidió avanzar mas en el análisis de la relevancia que ésta proteína celular tiene en la infección por el virus de la gripe. Para ello, se procedió a analizar distintas características del crecimiento del virus de la gripe en condiciones de silenciamiento de hCLE.

#### 1.3.1.- Estudio de la síntesis de proteínas virales en células con hCLE silenciada

Se inició el análisis del efecto de la disminución de hCLE sobre la infección por el virus de la gripe estudiando la síntesis de las proteínas virales en estas condiciones. Para ello se realizó un marcaje metabólico *in vivo* durante una cinética de infección en células HEK-293T silenciadas o sin silenciar. Los resultados que se muestran en la **Figura 18** indican que no existen diferencias significativas en la síntesis de



**Figura R18. Síntesis de proteínas virales en células con hCLE silenciada.**

Se infectaron monocapas de células HEK-293T, con hCLE silenciada o sin silenciar, con la cepa A/Victoria/3/75 a 3 pfu/célula. A los tiempos indicados se realizó un marcaje metabólico con  $^{35}\text{S}$ -Met-Cys. Las proteínas marcadas se analizaron por autoradiografía y posteriormente se realizó un *Western blot* anti  $\beta$ -Tubulina como control de carga.

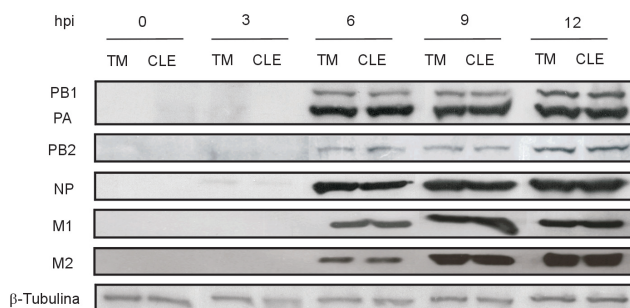
las principales proteínas virales al silenciar hCLE.

### 1.3.2.- Análisis de la acumulación de proteínas virales en condiciones de silenciamiento de la proteína hCLE

En vista de los resultados del apartado anterior, se analizó por *Western blot* la acumulación de algunas proteínas virales a lo largo de la infección en células silenciadas o sin silenciar. La acumulación de las distintas proteínas

virales, independientemente de si fueron de expresión temprana (subunidades de la polimerasa y NP) o tardía (M1 y M2), no se vio afectada por la disminución de hCLE a ninguno de los tiempos analizados (Figura 19). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos anteriormente en el análisis de la síntesis de proteínas

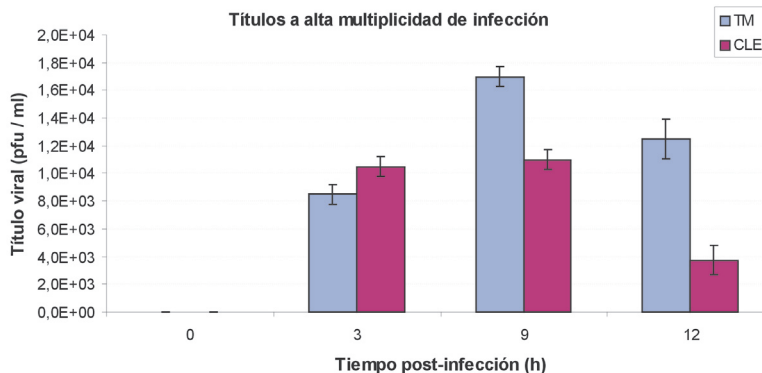
### 1.3.4.- Análisis de la producción de virus en infección a alta multiplicidad en células con hCLE silenciada



**Figura 19. Acumulación de las proteínas virales en células con hCLE silenciada.**

Se infectaron monocapas de células HEK-293T, con hCLE silenciada o sin silenciar, con la cepa A/Victoria/3/75 a 3 pfu/célula. A los tiempos indicados se recogieron las células en tampón *Laemmli*, las muestras se separaron por SDS-PAGE y las proteínas virales indicadas y  $\beta$ -Tubulina se analizaron por *Western blot*.





**Figura 20. Producción de virus en un solo ciclo en células con hCLE silenciada.**

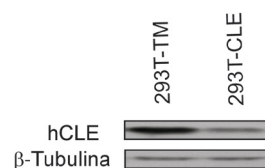
Se infectaron monocapas de células HEK-293T, con hCLE silenciada o sin silenciar, con la cepa A/Victoria/3/75 a 5 pfu/célula. A los tiempos indicados se recogieron alícuotas del medio del cultivo y se determinó la cantidad de partículas infecciosas por ensayo de placa.

Seguidamente, se analizó la producción de partículas infecciosas durante un solo ciclo de infección. Para ello, células HEK-293T previamente transfectadas con los plásmidos pS-hCLE 121-143 y pS-TM se infectaron a alta multiplicidad de infección (5 pfu/célula). A distintos tiempos de infección se recogieron alícuotas del medio de cultivo y se determinó el título de virus presente por ensayo de placa. Como se puede observar en la **Figura 20**, en las células con CLE silenciada se producen menores cantidades de virus infectivos que en las células que no han sido silenciadas.

### 1.3.5.- Análisis de la producción de virus en infecciones a baja multiplicidad con el virus de la gripe en células con hCLE silenciada

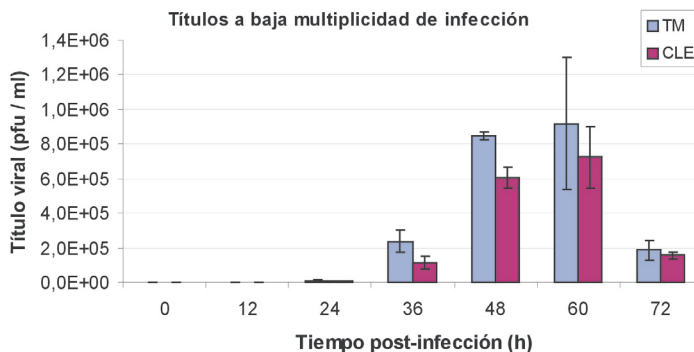
Seguidamente se quiso analizar la replicación de virus en varios ciclos de infección en células con hCLE silenciada. Pero ello presentaba problemas técnicos en cuanto al mantenimiento del silenciamiento a lo largo de todo el experimento ya que por un lado había que dejar un mínimo de 24hs entre la transfección del plásmido

de silenciamiento y la infección. Por otro lado, una vez infectadas las células, no se podían volver a transfectar para mantener el silenciamiento. Esto implicaba que el silenciamiento debería mantenerse durante 96hs, cuando ya habíamos observado que a partir de las 48hs el silenciamiento comenzaba a perderse. Para evitar este inconveniente, se decidió generar líneas estables que expresaran el silenciador de CLE o su control TM. Para ello se transfectaron células HEK-293T con los plásmidos pSR-PURO-TM y pSR-PURO-



**Figura 21. Generación de líneas estables silenciadas.**

Se transfectaron células HEK-293T, con el plásmido pSR-PURO-hCLE 121-143 o el plásmido pSR-TM y posteriormente se seleccionaron las células con puomicina. Una vez establecidos los clones, se recogieron extractos celulares en tampón *Laemmli*, las muestras se separaron por SDS-PAGE y las proteínas hCLE y  $\beta$ -Tubulina se analizaron por *Western blot*.



**Figura R22. Producción de virus un múltiples ciclos en células con hCLE silenciada.**

Se infectaron monocapas de células HEK-293T, con hCLE silenciada o sin silenciar, con la cepa A/Victoria/3/75 a  $10^{-3}$  pfu/célula. A los tiempos indicados se recogieron alícuotas del medio del cultivo y se determinó la cantidad de partículas infecciosas por ensayo de placa.

hCLE 121-143 y se procedió a la selección de las células con la droga puromicina. Como se observa en la **Figura 21**, efectivamente, las células establemente silenciadas (293T-CLE) presentan una menor cantidad de hCLE que las células estables obtenidas con el plásmido control (293T-TM).

Con estas células se llevó a cabo el análisis de la producción de virus en varios ciclos. Para ello, se infectaron las células estables a baja multiplicidad de infección ( $10^{-3}$  pfu/ml), se recogieron alícuotas de medio de cultivo a distintos tiempos tras la infección y se determinó el título mediante ensayo de placa. En estas condiciones se observa una tendencia en la cual en las células con hCLE silenciada se obtiene una menor producción de virus, aunque las diferencias obtenidas son pequeñas (**Figura 22**).

#### 1.4.- Estudio del efecto que la infección por el virus de la gripe tiene sobre la proteína celular hCLE

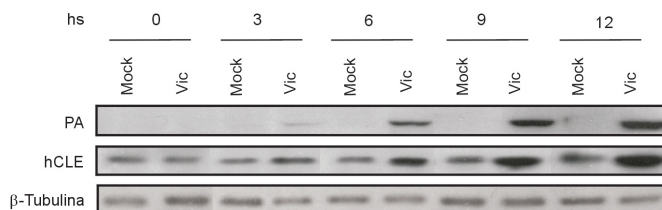
Para completar el estudio de la relevancia funcional de hCLE en el ciclo infeccioso por el virus de la gripe, se decidió analizar

si la infección tenía efectos sobre dicha proteína. Para ello, y aprovechando que ya se disponía de un anticuerpo comercial que permitía analizar la proteína por *Western blot* a partir de extractos totales, se infectaron células HEK-293T con la cepa VIC. Se recogieron extractos a distintos tiempos de infección y se analizó por *Western blot* la acumulación de las proteínas hCLE,  $\beta$ -Tubulina y PA como medida del progreso de la infección. Como se observa en la **Figura 23**, en las células infectadas se observa un aumento de la acumulación de hCLE que comienza alrededor de las 6 hpi y continúa a medida que progresa la infección.

#### 1.5.- Estudio de la incorporación de hCLE en viriones

El aumento de la proteína hCLE observado en el apartado anterior nos hizo preguntarnos si la proteína se incorporaba en los viriones generados durante la infección. Para analizar esta posibilidad, se infectaron células HEK-293T con la cepa VIC a alta multiplicidad de infección (1 pfu/célula) y a las 8 hpi se las trató de acuerdo al procedimiento descrito en el



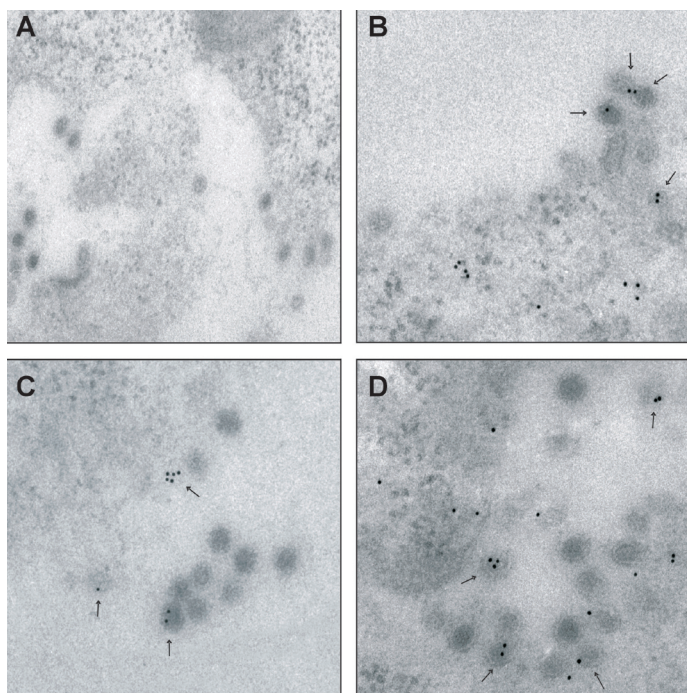


**Figura 23. Acumulación de la proteína hCLE durante la infección.**

Se infectaron monocapas de células HEK-293T con la cepa A/Victoria/3/75 a 5 pfu/célula. A los tiempos indicados se recogieron las células en tampón *Laemmli*. Las muestras se separaron por SDS-PAGE y las proteínas hCLE, β-Tubulina y la subunidad PA de la polimerasa viral se analizaron por *Western blot*.

apartado 9.4 de Materiales y Métodos para la preparación de cortes celulares. Dichos cortes se utilizaron para el marcaje por *immunogold* utilizando un anticuerpo anti-hCLE o su pre-inmune como control. Posteriormente, se procedió a la obtención de imágenes de microscopía electrónica. Como se observa en la **Figura 24, paneles**

**B-D**, el marcaje con el anticuerpo anti-hCLE permite detectar la presencia de dicha proteína en viriones del virus de la gripe, mientras que al utilizar el anticuerpo control no se observa marcaje en las partículas virales (**Figura 24, panel A**).



**Figura 24. Incorporación de hCLE en viriones del virus de la gripe.**

Se infectaron monocapas de células HEK-293T con la cepa A/Victoria/3/75 a 1 pfu/célula. A 8 hpi, las células se fijaron, criopreservaron y vitrificaron. Secciones ultrafinas de estas muestras se inmunomarcaron con anticuerpo anti-hCLE o su preinmune conjugados con oro coloidal. Finalmente, las muestras se analizaron por microscopía electrónica. **A.-** Anticuerpo control. **B-D.-** Anticuerpo anti-hCLE.

## 2.- ESTUDIO DEL EFECTO QUE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA GRIPE TIENE SOBRE LA MAQUINARIA DE TRANSCRIPCIÓN CELULAR

La transcripción del virus de la gripe implica un mecanismo de *cap-snatching* por el cual la polimerasa viral reconoce las estructuras cap de los pre-mensajeros (pre-mRNAs) celulares y los corta para dar lugar a oligonucleótidos de entre 9-15nt con una estructura cap en su extremo 5' (Caton and Robertson, 1980; Dhar et al., 1980; Krug et al., 1979; Plotch et al., 1979). Estos oligonucleótidos son utilizados como *primers* por la polimerasa viral para la síntesis de los mRNAs virales (Bouloy et al., 1978; Plotch et al., 1981). Debido a este requerimiento por el cap de los pre-mRNAs celulares, se ha propuesto que existe una unión funcional entre la transcripción celular y la viral (Elton, 2005). De acuerdo con esto, se ha descrito que el complejo de la RNA polimerasa viral interacciona con el dominio carboxi-terminal (CTD) de la subunidad mayor de la RNA polimerasa II (RNAP II), más precisamente con las formas hipofosforilada y fosforilada en Serina 5 (Ser5), mientras que no lo hace con la forma fosforilada en Serina 2 (Ser2) (Engelhardt et al., 2005).

Por otra parte, en estudios realizados en nuestro laboratorio se demostró que la proteína celular hCLE se encuentra en complejos con las formas hipo e hiperfosforilada de la RNAP II y es un modulador positivo de la transcripción mediada por dicha polimerasa (Pérez-González et al., 2006). Como se detalló anteriormente, también se demostró que hCLE interacciona con la subunidad PA de la polimerasa viral, tanto *in vitro* como *in vivo*

y que copurifica con RNPs virales activas (Huarte et al., 2001). Además se determinó que esta proteína también interacciona, *in vivo* e *in vitro*, con la subunidad PB2 y que existe, en el núcleo de células infectadas, colocalización de hCLE y RNPs virales (Pérez-González, 2007). Todos estos datos nos llevaron a explorar si ocurren cambios en los niveles de la RNAP II o en su patrón de fosforilación durante la infección con el virus de la gripe.

### 2.1.- Estudio del efecto de la infección por el virus de la gripe sobre la subunidad mayor del complejo de la RNAP II

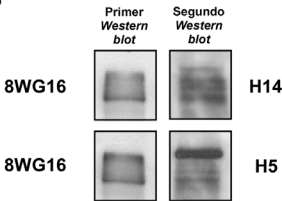
Con el objetivo de analizar si la infección por el virus de la gripe produce cambios en la acumulación o estado de fosforilación de la RNAP II, se infectaron células HEK-293T con la cepa humana A/Victoria/3/75 (VIC) y a distintas horas post-infección (hpi) se recogieron extractos celulares que se analizaron por Western blot con anticuerpos que reconocen distintas formas fosforiladas del CTD de la RNAP II. Estos anticuerpos han sido producidos utilizando como epítomos diferentes formas fosforiladas del heptapéptido YS2PTS5PS. En la **Figura 13 A** se describe el patrón de reconocimiento de péptidos del CTD de dichos anticuerpos al ser analizados mediante ensayos de Biacore (Jones et al., 2004). El anticuerpo 8WG16 principalmente detecta la RNAP II hipofosforilada; el anticuerpo H5 detecta la RNAP II fosforilada en Ser2, en Ser5 o en Ser5 + Ser2; y el anticuerpo H14 reconoce principalmente la RNAP II fosforilada en Ser5 y también la forma fosforilada en Ser5 + Ser2. De acuerdo con esto, y como se observa en la **Figura 13 B**, paneles

A

Dependencia de la fosforilacion de los anticuerpos monoclonales anti-CTD

Nombre	Epitopo (Y1S2P3T4S5P6S7)	Reconocimiento en Biacore (Jones et al. J. Biol. Chem. 2004)
8WG16	Defosforilado	Repeticiones defosforiladas (Sin afinidad por repeticiones conteniendo Ser2-P)
H14	Ser5-P	Ser5-P y Ser5-P + Ser2-P
H5	Ser2-P	Ser2-P, Ser5-P y Ser5-P + Ser2-P

B

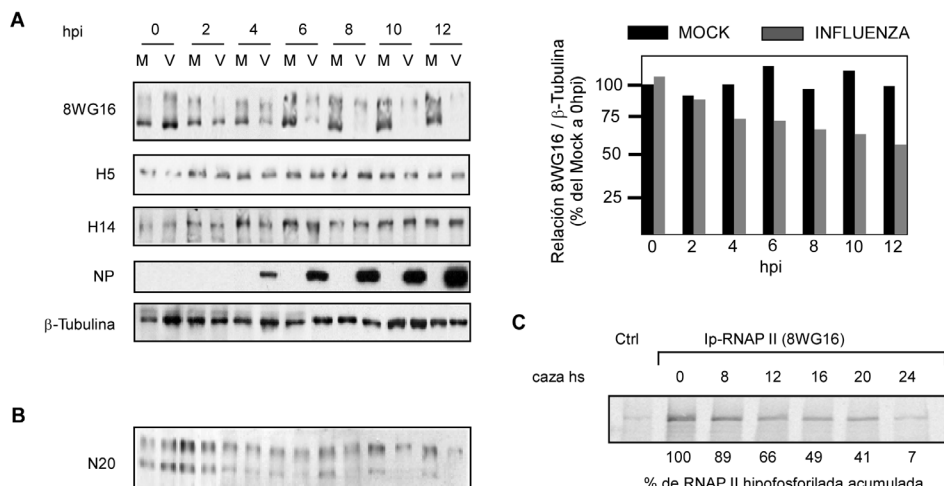


**Figura 25. Patrón de reconocimiento de los anticuerpos monoclonales anti-CTD de la RNAP II.**

**A.** Epítopos reconocidos en ensayos de Biacore por los anticuerpos monoclonales 8WG16, H14 y H5. Tomado de Jones et al. 2004. **B.** Patrón obtenido al utilizar los anticuerpos H14 y H5 en *Western blot* de membranas previamente incubadas con el anticuerpo 8WG16. Se observa que las formas reconocidas por los anticuerpos H14 y H5 tienen distinta movilidad, y por tanto son distintas, de las obtenidas con el anticuerpo 8WG16.

de la izquierda, el anticuerpo 8WG16 principalmente reconoce dos especies de la RNAP II. La banda con menor movilidad electroforética no corresponde a las formas fosforiladas en Ser5 o Ser2, ya que al incubar la misma membrana con los anticuerpos monoclonales H14 o H5, se observa una banda adicional correspondientes a estas formas hiperfosforiladas (**Figura 13 B, paneles de la derecha**). Por lo tanto, la banda superior reconocida por el anticuerpo 8WG16 puede representar una RNAP II con fosforilaciones intermedias u otras modificaciones post-traduccionales como glicosilaciones e isomerización cis-trans de las prolinas (Meinhart et al., 2005) o fosforilaciones en otros residuos del heptapéptido, ya que se ha descrito que la Serina en posición 7 (Ser7) se fosforila durante la transcripción (Chapman et al., 2007; Egloff et al., 2007). Como se observa en la **Figura 26 A, panel 8WG16**, al utilizar el anticuerpo 8WG16 se observa que la acumulación de la RNAP II comienza a disminuir alrededor de las 4 hpi en las células infectadas, teniendo niveles casi indetectable a tiempos tardíos

de infección (10-12hs). Por el contrario, los niveles de acumulación de las formas hiperfosforiladas en Ser2 y Ser5 (**paneles H5 y H14, respectivamente**) no disminuyen durante la infección. El progreso de la infección se verificó analizando los niveles de acumulación de la nucleoproteína viral y la acumulación de  $\beta$ -Tubulina se utilizó como control de carga. Además, en el **gráfico de la derecha de la Figura 26 A** se muestra la cuantificación de la cantidad de RNAP II hipofosforilada total en células infectadas y sin infectar. En el mismo se observa una reducción de aproximadamente el 50% a tiempos tardíos de infección. Por otra parte, la degradación de la RNAP II también se observó con un anticuerpo que reconoce la parte amino-terminal de la subunidad mayor (**Figura 26 B**). En este caso, la disminución de la acumulación de la RNAP II fue menor y principalmente afectó a la forma con mayor movilidad electroforética, que debería corresponder a la forma hipofosforilada. Por otra parte, se analizó la presencia de productos de degradación, tanto con anticuerpos que reconocen el amino como



**Figura 26. Análisis de los niveles de acumulación de la subunidad mayor de la RNAP II presentes en las células infectadas por el virus de la gripe.**

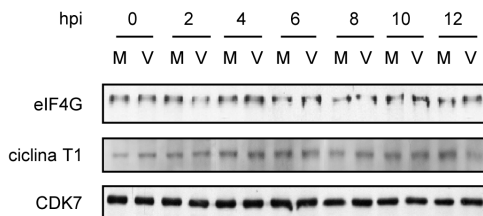
**A.** Se infectaron células HEK-293T con la cepa VIC y a distintas hpi se recogieron extractos en tampón Laemmli. Las muestras se utilizaron para analizar por *Western blot* las formas hipofosforilada (8WG16) y fosforiladas en Ser2 (H5) y Ser5 (H14) del CTD de la subunidad mayor de la RNAP II y las proteínas indicadas. En el gráfico de la derecha se muestra la cuantificación de la forma hipofosforilada de la RNAP II. Se realizaron cinco experimentos y se muestra un experimento representativo. **B.** Los extractos anteriores se utilizaron para analizar por *Western blot* la subunidad mayor de la RNAP II con un anticuerpo que reconoce su extremo amino-terminal (N20). **C.** La vida media de la forma hipofosforilada de la subunidad mayor de la RNAP II se analizó en células HEK-293T mediante marcaje con [<sup>35</sup>S]Met/Cys. El anticuerpo 8WG16 se utilizó para inmunoprecipitar la RNAP II hipofosforilada. Ctrl, inmunoprecipitación con anticuerpo control HA. M, células sin infectar; V, células infectadas con la cepa VIC del virus de la gripe.

el carboxi-terminal de la RNAP II, pero no se observó la aparición de ningún fragmento a lo largo de la infección (datos no mostrados).

Es ampliamente conocido que la infección por el virus de la gripe produce un *shut-off* en la síntesis de proteínas celulares (Aragón et al., 2000; Garfinkel and Katze, 1993). Debido a esto, y dependiendo de la vida media de cada proteína, su acumulación puede disminuir durante la infección por el virus de la gripe. Por tanto, se decidió analizar la vida media de la subunidad mayor de la RNAP II para descartar que la desaparición observada durante la infección se deba a que dicha proteína tiene una vida media particularmente corta. Para ello, se realizaron experimentos de pulso y caza en células HEK-293T y los

extractos celulares se inmunoprecipitaron con el anticuerpo 8WG16. Como se observa en la **Figura 26 C**, la vida media de la subunidad mayor de la RNAP II es de alrededor de las 16hs. La vida media de las formas hiperfosforiladas de la RNAP II fue similar a la forma hipofosforilada (datos no mostrados). Por tanto, estos datos indican que se produce una degradación específica de la forma hipofosforilada de la RNAP II durante la infección con el virus de la gripe, que no es consecuencia del *shut-off* inducido durante la infección.

Para estudiar mas detalladamente la especificidad de la degradación, se analizó el comportamiento del factor de traducción eIF4GI, ya que se conoce que tiene una vida media de mas de 12hs en células humanas, pero es muy susceptible a la



**Figura 27. Análisis de la acumulación de otras proteínas celulares**

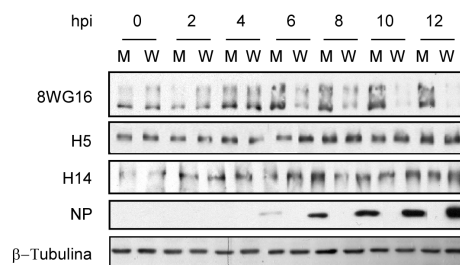
Células HEK-293T se infectaron con la cepa VIC y a distintas hpi las proteínas indicadas se analizaron por Western blot. M, células sin infectar; V, células infectadas con la cepa VIC del virus de la gripe.

degradación (Clemens et al., 1998; Morley et al., 1997). Como se presenta en la **Figura 27**, no se observaron variaciones en la acumulación de eIF4G durante la infección con el virus de la gripe.

Finalmente, se analizaron posibles cambios en las principales kinasas que fosforilan el CTD de la RNAP II. En la **Figura 27**, paneles **ciclina T1** y **CDK7** se observa que no hay variaciones en los niveles de acumulación de la ciclina T1, responsable de regular la ciclina CDK9, ni en la ciclina CDK7, lo cual está de acuerdo con la ausencia de cambios en las formas hiperfosforiladas de la RNAP II.

## 2.2.- Análisis de la influencia de la cepa viral y el origen del tipo celular en la degradación de la forma hipofosforilada de la RNAP II

Para corroborar la validez de la observación realizada en el apartado anterior para otras cepas del virus de la gripe, se llevaron a cabo experimentos similares pero utilizando la cepa adaptada a ratón A/WSN/33 (WSN) para infectar células HEK-293T. Como se observa en la **Figura 28**, mientras que las formas hiperfosforiladas permanecen sin cambio a lo largo de la



**Figura 28. Degradación de la forma hipofosforilada de la RNAP II por la cepa WSN del virus de la gripe.**

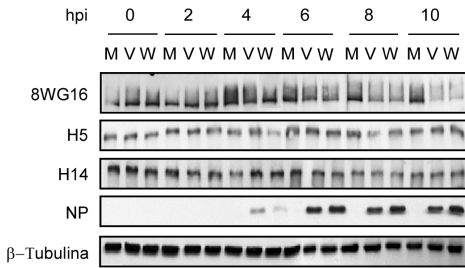
Células HEK-293T se infectaron con la cepa WSN a alta multiplicidad. A distintas hpi se recogieron extractos celulares en tampón Laemmli que se utilizaron para analizar por *Western blot* las proteínas señaladas. M, células sin infectar; W, células infectadas con la cepa WSN del virus de la gripe.

infección, la cepa WSN, al igual que la cepa VIC, produce degradación de la forma hipofosforilada de la RNAP II. Sin embargo, en este caso la degradación está ligeramente retrasada, comenzando alrededor de las 6 hpi.

Para estudiar si este retraso se debe a requerimientos específicos de interacciones entre la célula hospedadora y la cepa viral, se realizó el mismo experimento en las células de origen murino NIH-3T3. Los resultados parecen indicar que en estas células, la degradación de la forma hipofosforilada de la RNAP II producida por la cepa WSN comienza alrededor de las 4 hpi, mientras que la cepa VIC produce una degradación un tanto más retrasada **Figura 29**. Nuevamente, las formas hiperfosforiladas no sufren cambios debidos a la infección por el virus de la gripe.

Finalmente, se estudió la degradación producida por ambas cepas virales en otras líneas celulares de diferentes orígenes. Para ello se infectaron células HeLa (humano), COS-1 (mono) y NLB2 (perro) y a 10 hpi se recogieron los





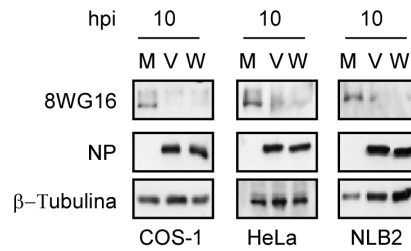
**Figura 29. Degradación de la RNAP II y relación entre la célula hospedadora y la cepa viral.**

Se infectaron células NIH-3T3 con las cepas VIC (V) y WSN (W) y los extractos celulares se analizaron como en la **Figura 26**.

extractos celulares que se analizaron por *Western blot*. Como se muestra en la **Figura 30**, independientemente del origen de las células, las 2 cepas del virus de la gripe produjeron la degradación específica de la forma hipofosforilada del a RNAP II. Conjuntamente, estos resultados indican que la degradación específica de la forma hipofosforilada de la RNAP II que ocurre durante la infección con el virus de la gripe es independiente de la cepa viral y origen de las células hospedadora.

### 2.3.- Estudio de la relación entre la degradación y la actividad de la RNAP II

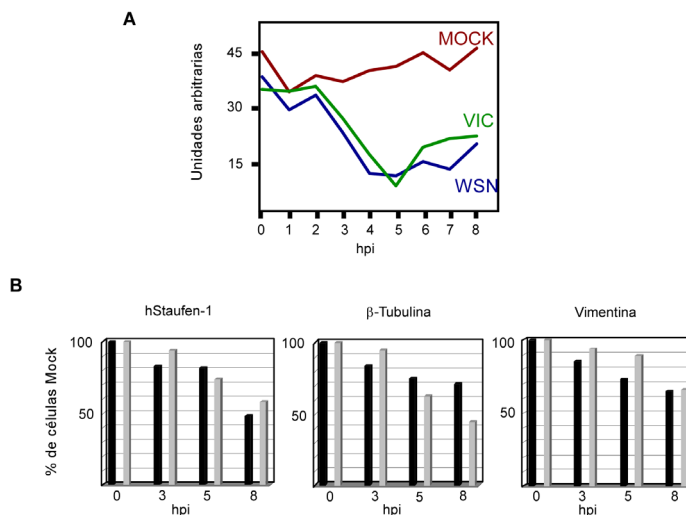
Para estudiar si la degradación de la forma hipofosforilada conlleva cambios en la actividad de la RNAP II se realizaron ensayos de síntesis de RNA *in vitro*. Para ello, a distintos tiempos se aislaron núcleos de células HEK-293T sin infectar o infectadas con las cepas VIC o WSN. Posteriormente, se utilizaron dichos núcleos para realizar ensayos de síntesis de RNA *in vitro*, tratando o no las muestras con 5µg/ml de  $\alpha$ -amanitina con el fin de poder determinar específicamente la actividad de la RNAP II. De esta forma, la



**Figura 30. Degradación de la RNAP II en diferentes célula hospedadoras.**

Células COS-1, HeLa y NLB2 se infectaron con las cepas VIC (V) y WSN (W). A 10 hpi se analizó la presencia de la RNAP II y de las demás proteínas indicadas por *Western blot*

actividad de la RNAP II se calcula como la diferencia entre los valores obtenidos sin  $\alpha$ -amanitina (síntesis celular total mediada por RNAP I + RNAP II + RNAP III) y con la droga (síntesis debida a RNAP I + RNAP III). Como se observa en la **Figura 31 A**, la síntesis de mRNA celular no cambia durante el tiempo ensayado en las células sin infectar. Por el contrario, una importante inhibición de la síntesis mediada por RNAP II se observa en las células infectadas, independientemente de la cepa utilizada. Esta inhibición alcanza su máximo alrededor de las 4-5 hpi y perdura durante toda la infección. Para confirmar esta observación, se analizó la síntesis de mRNAs de genes celulares específicos. Para ello, los RNAs sintetizados *in vitro* de las células infectadas o sin infectar se utilizaron como sondas en experimentos de *dot-blot* utilizando los cDNAs de los genes de hStaufen-1,  $\beta$ -Tubulina y Vimentina como se detalla en el apartado 10.4 de Materiales y Métodos. Tanto con la cepa VIC (**barras negras**) como con WSN (**barras grises**) se observa una progresiva reducción en la síntesis de estos mRNAs durante la infección **Figura 31 B**, llegando con los 3 genes, y a tiempos tardíos, a bajar alrededor de un 50% con respecto a



**Figura 31. Inhibición de la síntesis de mRNA celular durante la infección por el virus de la gripe.**

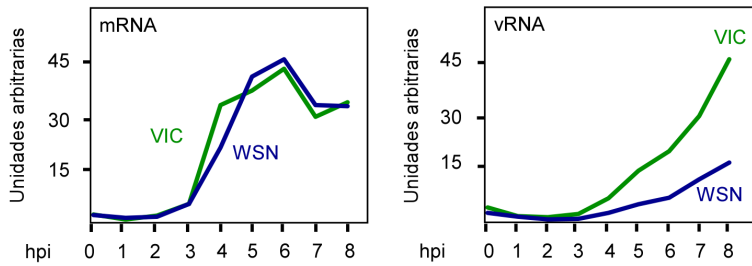
**A.** A las hpi indicadas se aislaron núcleos de células HEK-293T sin infectar o infectadas con las cepas VIC o WSN. Estos núcleos se utilizaron para medir la síntesis de RNA total mediante la incorporación *in vitro* de ribonucleótidos marcados en presencia o ausencia de  $\alpha$ -amanitina (5  $\mu$ g/ml). La síntesis de mRNA debida a la actividad de la RNAP II se calcula como la diferencia entre los valores obtenidos sin la droga (síntesis total de RNAP I + RNAP II + RNAP III) y con la droga (síntesis de RNAP I + RNAP III). **B.** El RNA total marcado de la parte A se utilizó como sonda en experimentos de *dot blot* para analizar la síntesis de mRNAs de distintos genes. Quinientos nanogramos de los cDNAs de hStaufen-1,  $\beta$ -Tubulina y Vimentina se fijaron a la membrana y la marca fue cuantificada en un Phosphorimager. Barras negras, células infectadas con la cepa VIC; barras grises, células infectadas con la cepa WSN.

las células sin infectar. Estos datos indican que existe una inhibición de la síntesis de mRNAs celulares durante la infección con el virus de la gripe y que dicha inhibición se correlaciona con el comienzo de la degradación de la forma hipofosforilada de la RNAP II.

## 2.4.- Análisis del patrón de transcripción y replicación del RNA viral

Para estudiar si la degradación de la RNAP II producida por la infección podría ser una consecuencia directa de las cinéticas de transcripción y replicación viral, se decidió analizar los niveles de RNA viral positivo y negativo durante la infección. Para ello, a distintos tiempos se aisló el RNA total de células HEK-293T sin infectar o infectadas con las cepas VIC y WSN. Dicho RNA se utilizó para la detección por *Northern*

*blot* de los RNAs positivo y negativo de la nucleoproteína viral, utilizando para ello sondas de oligonucleótidos. Como se observa en la **Figura 32, gráfico izquierda**, la acumulación de los RNAs virales de polaridad positiva (mRNA + cRNA, aunque los datos representan principalmente mRNA, ya que la cantidad de cRNA es mucho menor que la de mRNA (Hatada et al., 1989)), alcanza su máximo entre las 5 y 6 hpi con ambas cepas, tiempos en los que se comienza a observar la degradación de la RNAP II. Por su parte, la acumulación del vRNA **Figura 32, gráfico derecha** comienza alrededor de las 4 hpi y continúa incrementándose a lo largo de toda la infección. A diferencia del mRNA, las cantidades de vRNA obtenidas con la cepa VIC son mayores que las obtenidas con WSN, lo que puede



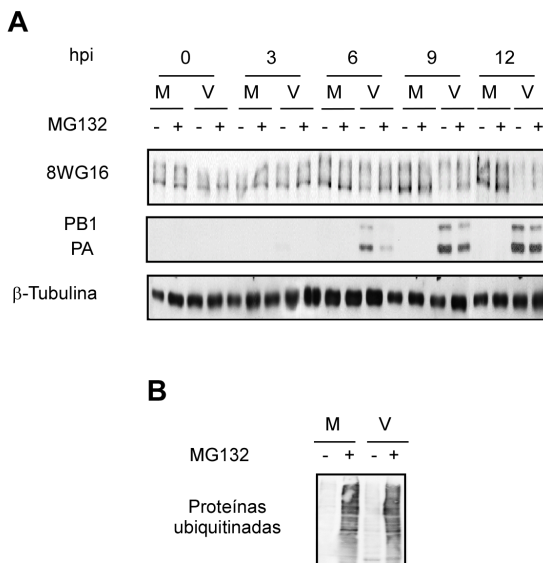
**Figura 32. Niveles de acumulación del RNA viral positivo y negativo en células infectadas con el virus de la gripe.**

Células HEK-293T se infectaron con las cepas VIC o WSN y a las hpi indicadas se aisló el RNA total que fue utilizado para detectar los RNAs de polaridad positiva (mRNA, gráfico de la izquierda) y negativa (vRNA, gráfico de la derecha) de la nucleoproteína viral por Northern blot.

deberse a una mejor adaptación de esta cepa a la célula hospedadora debido a su origen humano. Estos resultados indican que, aunque las cepas VIC y WSN tienen un patrón diferente de replicación del RNA viral, ambos producen una degradación similar de la forma hipofosforilada de la RNAP II.

## 2.5.- Estudio de la implicación del proteosoma en la degradación de la forma hipofosforilada de la RNAP II

La degradación de la RNAP II puede ser consecuencia de la actividad de alguna proteína viral o de algún proceso proteolítico celular activado durante la infección. La degradación proteosomal mediada por ubiquitina es el proceso proteolítico mas importante en eucariotas. Para evaluar la contribución de este proceso en la degradación de la RNAP II, células HEK-293T fueron infectadas o no en presencia o ausencia del inhibidor del proteosoma MG132, que fue agregado



**Figura 33. Implicación del proteosoma en la degradación de la RNAP II.**

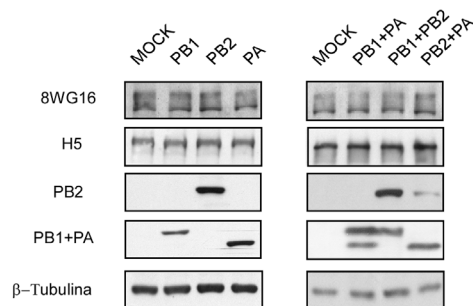
**A.** Células HEK-293T infectadas con la cepa VIC (V) o sin infectar (M) fueron tratadas (+) o no (-) con el inhibidor del proteosoma MG132. A las hpi indicadas, la forma hipofosforilada de la RNAP II (8WG16) y las demás proteínas indicadas fueron analizadas por Western blot. **B.** Western blot con anticuerpo anti-ubiquitina de células infectadas y sin infectar del panel A a 12 hpi.



1h antes de la infección. A diferentes hpi se recogieron extractos celulares y se analizaron los niveles de acumulación de las proteínas virales y la forma hipofosforilada de la RNAP II. En la **Figura 33 A** se observan los resultados. Aunque el progreso de la infección, analizado por la aparición de las proteínas PB1 y PA, está ligeramente retrasado en las células tratadas, se observa casi una total degradación de la forma hipofosforilada de la RNAP II a 12 hpi en las células infectadas en ambas condiciones. Como control de la efectividad del MG132, los extractos celulares se analizaron con un anticuerpo anti-ubiquitina (**Figura 33 B**) observándose una importante acumulación de proteínas ubiquitinadas en las células tratadas. Estos resultados indican que la maquinaria de degradación proteosomal puede tener algún papel en la infección por el virus de la gripe, pero no es responsable de la degradación de la RNAP II producida durante la infección.

## 2.6.- Determinación de las proteínas virales implicadas en la degradación de la RNAP II

Habiendo descartado la implicación del principal proceso proteolítico celular, se decidió analizar la posible contribución de las proteínas virales en la degradación de la RNAP II. Por ello, y teniendo en cuenta la descrita asociación de la polimerasa viral con la RNAP II (Engelhardt et al., 2005), se decidió estudiar la posibilidad de que los componentes de la polimerasa del virus de la gripe indujeran la degradación de la forma hipofosforilada de la RNAP II. Para ello, se transfectaron células HEK-293T con los plásmidos pCDNA-PB1, pCDNA-PB2 y pCDNA-PA que



**Figura 34. Análisis de la capacidad de las subunidades de la polimerasa viral o dímeros de estas para degradar la RNAP II.**

Células HEK-293T fueron transfectadas con plásmidos que expresan las subunidades PB1, PB2 o PA de forma individual (panel izquierdo) o con combinaciones de dos de ellos (panel derecho) y a 16 h post-transfección las cantidades de las formas hipofosforilada (8WG16) y fosforilada en Ser-2 (H5) de la RNAP II y las demás proteínas indicadas fueron analizadas por *Western blot*.

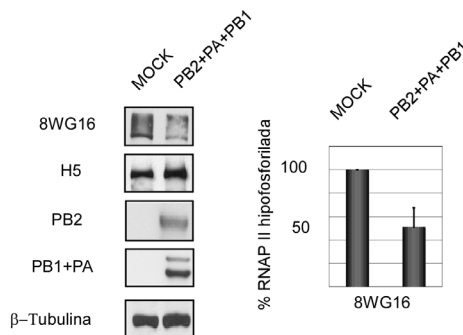
expresan las subunidades PB1, PB2 o PA de la cepa VIC, o combinaciones de dos de estos plásmidos. A las 16hs post-transfección, se recogieron extractos celulares y se analizaron por *Western blot* los niveles de acumulación de las distintas formas de fosforilación de la RNAP II. Los resultados obtenidos indican que ni la expresión individual de las subunidades de la polimerasa viral ni la combinación de dos de ellas induce la degradación de la forma hipofosforilada de la RNAP II (**Figura 34, paneles izquierdo y derecho** respectivamente).

Seguidamente, se analizó si el complejo de la polimerasa viral puede inducir la degradación. Por lo tanto, se co-transfectaron células HEK-293T con los plásmidos de expresión de las tres subunidades de la polimerasa. Los resultados se observan en la **Figura 35** y muestran una disminución en los niveles de la forma hipofosforilada de la RNAP II, mientras que la forma fosforilada en

Ser2 se mantiene sin cambios. Además, en el **gráfico de la derecha** se muestra la cuantificación de la cantidad de RNAP II hipofosforilada en células transfectadas y sin transfectar con los tres plásmidos de expresión de las subunidades de la polimerasa. En el mismo se observa una reducción de aproximadamente el 50% al co-exresar las tres subunidades de la polimerasa viral. Estos resultados indican que el complejo de la polimerasa viral es suficiente para inducir la degradación de la RNAP II.

## 2.7.- Estudio de la implicación de la actividad proteolítica de PA en la degradación de la RNAP II

Anteriormente, en el laboratorio se describió que la expresión individual de la subunidad PA causa su propia degradación y la de proteínas co-expresadas (Sanz-Ezquerro et al., 1995). También se determinó que los 247 aminoácidos amino-terminales eran responsables de esta actividad (Sanz-Ezquerro et al., 1996) y ningún inhibidor de proteasas analizado, incluyendo inhibidores del proteosoma, fue activo inhibiendo esta actividad. Además, y al igual que con la degradación de la RNAP II producida durante la infección con el virus de la gripe, no se observaron fragmentos de degradación de las proteínas co-expresadas con PA. Por otra parte, se determinó que el cambio de treonina a alanina en la posición 157 de PA (T157A) disminuye su actividad proteolítica (Perales et al., 2000). Teniendo en cuenta toda esta información, se decidió analizar si la actividad proteolítica de PA puede estar involucrada en la degradación de la RNAP II observada durante la infección. Para ello, se infectaron células HEK-293T con un

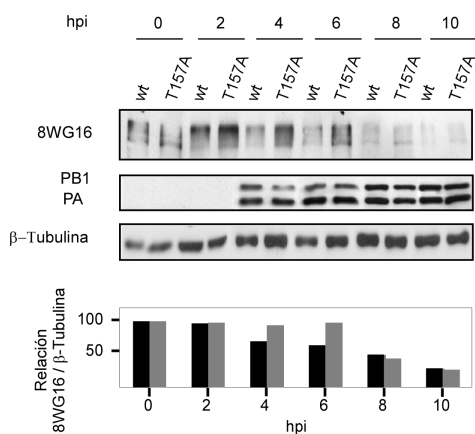


**Figura 35. Análisis de la capacidad de la polimerasa viral reconstituida para degradar la forma hipofosforilada de la RNAP II.**

Células HEK-293T fueron co-transfectadas con plásmidos que expresan las subunidades PB1, PB2 o PA y a 16 h post-transfección las cantidades de las formas hipofosforilada (8WG16) y fosforilada en Ser-2 (H5) de la RNAP II y las demás proteínas indicadas fueron analizadas por *Western blot*.

virus de la gripe recombinante conteniendo en el segmento de PA la mutación T157A o, como control, un virus recombinante con dicho segmento en su versión *wild-type*. El virus con la mutación T157A expresa una proteína PA menos proteolítica y no muestra cambios en el *shut-off* de la traducción celular inducido por la infección (Huarte et al., 2003). A diferentes hpi se recogieron extractos celulares en los que se analizaron por *Western blot* los niveles de la forma hipofosforilada de la RNAP II. Como se observa en la **Figura R36**, el virus recombinante con PA *wild-type* produce la degradación de la forma hipofosforilada con una cinética similar a la observada con la cepa VIC, esto es, comienza a observarse una disminución en los niveles de RNAP II alrededor de las 4 hpi, llegando a niveles casi indetectables a tiempos tardíos. Por el contrario, la infección con el virus que expresa una proteína PA mutante con menor actividad proteolítica, conduce a un retraso en la cinética de degradación de la forma hipofosforilada de la RNAP II,

aunque a tiempos tardíos los niveles de RNAP II remanentes son similares al virus control. En el **gráfico inferior** se muestra la cuantificación de la cantidad de RNAP II hipofosforilada en células infectadas con los virus *wild-type* (**barras negras**) y mutante (**barras grises**). En el mismo se observa claramente la menor degradación producida por el virus mutante a tiempos medios de infección (4-6 hpi). Estos resultados indican que la proteína PA está directa o indirectamente implicada en el proceso de degradación y sugiere que la actividad proteolítica de PA, en el contexto de la polimerasa viral, puede contribuir a la degradación de la forma hipofosforilada de la RNAP II que ocurre durante la infección.



**Figura 36. Análisis de la implicación de la actividad proteolítica de la subunidad PA en la degradación de la RNAP II.**

Células HEK-293T fueron infectadas con los virus recombinantes que expresan la proteína PA *wild-type* o con la mutación T157A y a diferentes hpi la forma hipofosforilada de la RNAP II (8WG16) y las proteínas indicadas se analizaron por *Western blot*. En el gráfico inferior se muestra la cuantificación de los niveles de la RNAP II hipofosforilada durante la infección. Se realizaron tres experimentos y se muestra un experimento representativo. Barras negras, virus recombinante que expresa la subunidad PA *wild-type*; barras grises, virus recombinante que expresa la proteína PA con la mutación T157A.

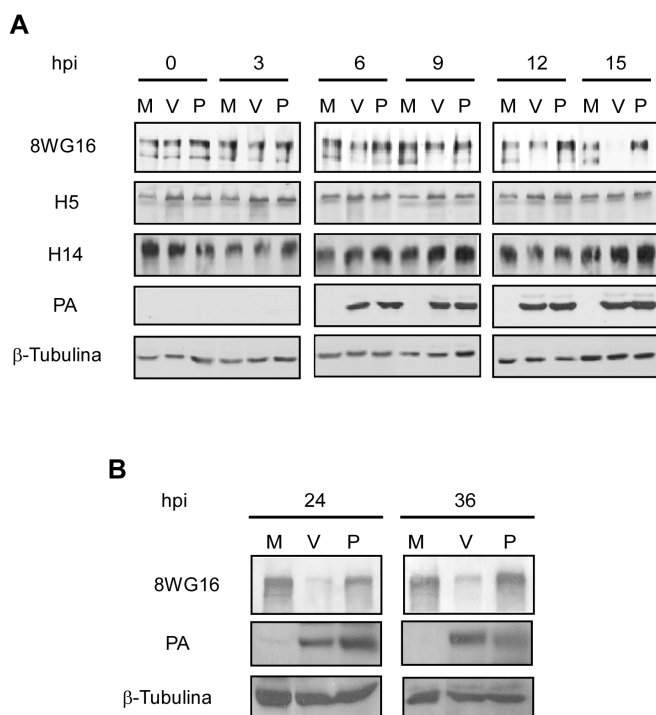
## 2.8.- Estudio de la capacidad de la cepa vacunal PR8 para degradar la RNAP II

La cepa A/PR/8/34 (PR8) del virus de la gripe ha sido utilizada durante más de 30 años para la producción de vacunas con virus inactivados. Estas vacunas contienen los segmentos de las seis proteínas internas del virus PR8 y los genes de HA y NA de los virus circulantes en la población en dicho año (Kilbourne, 1969). La cepa PR8 ha sido extensivamente pasada en ratones, hurones y huevos embrionados de pollo, lo que ha conducido a una incapacidad para replicar en humanos y a una atenuación de su virulencia para humanos (Beare et al., 1975). Aunque se ha demostrado que PR8 es patógeno para las cepas de ratón de laboratorio estándar, estos ratones carecen de un sistema de defensa antiviral completo debido a que tienen alelos defectivos para el gen Mx1 (Staehele et al., 1988), y además, PR8 tiene una baja virulencia en ratones Mx<sup>+/+</sup> (Grimm et al., 2007). Por el contrario, un mutante de PR8 hiper-virulento que crece rápidamente en células infectadas es altamente virulento en ratones Mx<sup>+/+</sup> (Grimm et al., 2007). Toda esta información nos hizo preguntarnos sobre la capacidad de dicho virus para inducir la degradación de la RNAP II y por lo tanto se decidió estudiar si PR8 induce la degradación de la RNAP II. Para ello, se infectaron células HEK-293T con las cepas PR8 y VIC como control y se analizaron los niveles de acumulación de la RNAP II a distintos hpi. Los resultados obtenidos muestran que, mientras que en las células infectadas con VIC los niveles de la forma hipofosforilada de la RNAP II comienzan a disminuir alrededor de las 6 hpi y son prácticamente indetectables a

15 hpi (**Figura 37 A**), no sucede lo mismo con PR8, incluso a tiempos muy tardíos de infección (**Figura 37 B**). Pese a esta falta de degradación, en las células infectadas con PR8 se observa un *band shift* desde la forma con mayor movilidad electroforética reconocida por el anticuerpo 8WG16, a la de menor movilidad, aunque como ya se explicó en el apartado 2.1 de esta sección, esta banda superior es distinta de las fosforiladas en Ser2 y Ser5 y debería representar un intermedio de fosforilación de la RNAP II u otro tipo de modificación postraducciona. Un *shift* similar ha sido descrito durante la infección por el virus Herpes Simplex tipo 1 (Rice et al., 1995; Rice et al., 1994). Por otra parte, y al igual de como se describió anteriormente para las cepas VIC y WSN, la infección con PR8 no produce cambios en las formas hiperfosforiladas de la RNAP II ni en otras proteínas celulares como  $\beta$ -Tubulina (**Figura 37 A**).

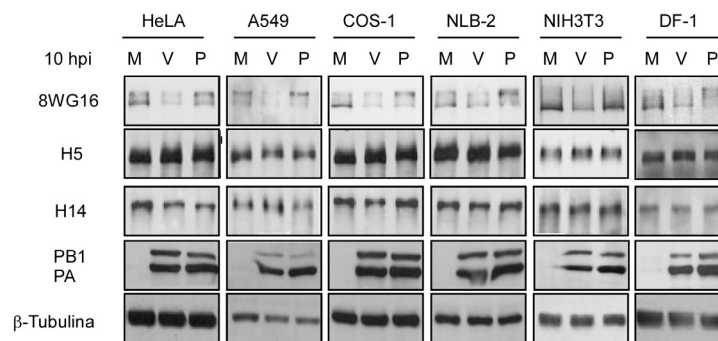
## 2.9.- Análisis de la influencia del origen del tipo celular en la incapacidad de la cepa PR8 para inducir la degradación de la RNAP II

Seguidamente se decidió analizar si la incapacidad de la cepa PR8 para producir la degradación de la RNAP II era dependiente de la relación entre la célula hospedadora y el virus. Para ello, se realizaron experimentos como los descritos en el apartado anterior pero en células de distintos orígenes, entre ellos humano (HeLa y A549), mono (COS-1), perro (NLB2), ratón (NIH-3T3) y pollo (DF-1). Como se observa en la **Figura 38**, y a diferencia de lo que sucede con la cepa VIC, en ninguna de estas líneas celulares al ser infectadas con PR8 se induce la degradación de la forma hipofosforilada de la RNAP II. Nuevamente, no se observan cambios en las formas hiperfosforiladas de la RNAP II ni en la acumulación de



**Figura 37. Análisis de la capacidad de la cepa PR8 para inducir la degradación de la RNAP II.**

**A.** Se infectaron células HEK-293T con las cepas VIC o PR8 y a distintas hpi se recogieron extractos en tampón Laemmli. Las muestras se utilizaron para analizar por *Western blot* las formas hipofosforilada (8WG16) y fosforiladas en Ser-2 (H5) y Ser-5 (H14) del CTD de la subunidad mayor de la RNAP II y las proteínas indicadas. **B.** Se realizaron experimentos similares a los descritos en A con tiempos de infección mayores. M, células sin infectar; V, células infectadas con la cepa VIC; P, células infectadas con la cepa PR8.



**Figura 38. Análisis de la capacidad de la cepa PR8 para inducir la degradación de la RNAP II en distintos tipos celulares.**

Células HeLa, A549, COS-1, NLB2, NIH-3T3 y DF-1 se infectaron con las cepas VIC o PR8. A 10 hpi la presencia de las distintas formas fosforiladas de la subunidad mayor de la RNAP II y las demás proteínas indicadas se analizó por *Western blot*. M, células sin infectar; V, células infectadas con la cepa VIC; P, células infectadas con la cepa PR8.

$\beta$ -Tubulina. Estos resultados indican que la cepa PR8 del virus de la gripe es incapaz de inducir la degradación de la subunidad mayor de la RNAP II independientemente del origen de la célula hospedadora infectada.

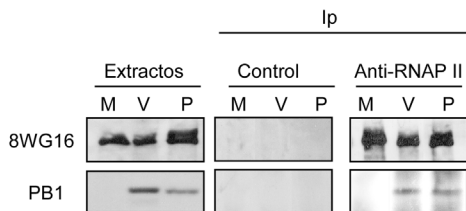
## 2.10.- Estudio de la relevancia de la asociación RNAP II-polimerasa viral en la degradación de la RNAP II

Como se explicó anteriormente, el complejo trimérico de la RNA polimerasa viral se asocia con las formas hipofosforilada y fosforilada en Ser-5 de la RNAP II (Engelhardt et al., 2005). Además, como se mostró en el apartado 2.6 de esta sección, las tres subunidades de la polimerasa viral de la cepa VIC son necesarias y suficientes para inducir la degradación de la RNAP II. Teniendo en cuenta estos datos, se decidió analizar si la asociación entre ambas polimerasas es un requisito para inducir la proteólisis de la RNAP II. Para ello, a 6 hpi se recogieron extractos de células HEK-293T sin infectar o infectadas con las cepas VIC o PR8. Dichos extractos se utilizaron para ensayos de co-inmunoprecipitación

de proteínas, utilizando el anticuerpo monoclonal 8WG16 que reconoce el CTD hipofosforilado para inmunoprecipitar la RNAP II y el anticuerpo monoclonal anti-HA como control. Posteriormente se evaluó la presencia de la polimerasa viral co-inmunoprecipitada por Western blot. Los resultados muestran que la subunidad PB1, utilizada como medida representativa de la polimerasa viral entera, co-precipita, y por lo tanto se asocia a la RNAP II, en cantidades similares en el caso de la cepa VIC y la cepa PR8 (**Figura 39**). Por tanto, la asociación de la polimerasa viral con la RNAP II puede ser un pre-requisito pero no es suficiente para producir su degradación.

## 2.11.- Estudio de la capacidad para degradar e inhibir la actividad de la RNAP II por diferentes cepas del virus de la gripe

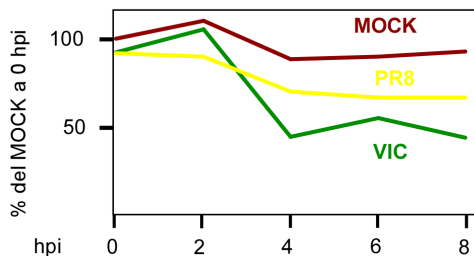
En el apartado 2.3 de esta sección se describió que la transcripción celular mediada por la RNAP II es inhibida durante la infección con la cepa VIC. Mientras que dicha cepa es capaz de degradar la



**Figura 39. Estudio de la asociación RNAP II-polimerasa viral.**

Se infectaron células HEK-293T con las cepas VIC o PR8. A las 6 hpi, se prepararon extractos celulares que se utilizaron para analizar la asociación polimerasa viral-RNAP II por ensayos de coimmunoprecipitación (Ip) con anticuerpos anti-RNAP II o anti-HA (Control). La presencia de la polimerasa viral y la RNAP II se analizó por Western blot con anticuerpos  $\alpha$ -PB1 (PB1) y  $\alpha$ -RNAP II (8WG16), respectivamente.

forma hipofosforilada de la RNAP II, la cepa PR8 no lo hace, por lo que se decidió evaluar si la ausencia de degradación de la RNAP II en la infección por ésta cepa se correlacionaba con cambios en la síntesis de mRNAs celulares. Por ello, se analizó la transcripción celular a distintas hpi en núcleos aislados de células HEK-293T sin infectar o infectadas con las cepas VIC o PR8. Los núcleos correspondientes se utilizaron en experimentos de *run-off* con o sin  $\alpha$ -amanitina para evaluar específicamente la actividad de la RNAP II. Como se observa en la **Figura 40**, con ambos virus se tiene una menor actividad de la RNAP II con respecto a las células sin infectar. Sin embargo, la infección con la cepa PR8 produce una menor inhibición de la transcripción celular que la que se produce durante la infección con la cepa VIC. Estos datos están de acuerdo con la ausencia de degradación de la RNAP II en la infección con PR8 y la degradación observada en la infección con la cepa VIC, sugiriendo que la degradación de la RNAP II contribuye a la inhibición de la transcripción celular que se observa



**Figura 40. Análisis de la inhibición de la síntesis de mRNA celular durante la infección con las cepas VIC y PR8.**

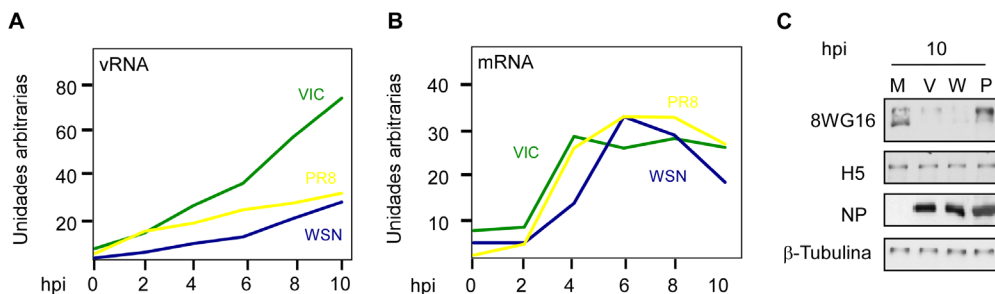
A las hpi indicadas se aislaron núcleos de células HEK-293T sin infectar o infectadas con las cepas VIC o PR8. Estos núcleos se utilizaron para medir la síntesis de RNA total mediante la incorporación *in vitro* de ribonucleótidos marcados en presencia o ausencia de  $\alpha$ -amanitina (5  $\mu$ g/ml). La síntesis de mRNA debida a la actividad de la RNAP II se calcula como la diferencia entre los valores obtenidos sin la droga (síntesis total de RNAPI + RNAP II + RNAP III) y con la droga (síntesis de RNAPI + RNAP III).

durante la infección con el virus de la gripe.

## 2.12.- Análisis de la contribución de la transcripción y replicación viral a la degradación de la RNAP II

Una posibilidad para explicar la incapacidad de PR8 para inducir la degradación de la RNAP II es que las actividades de transcripción y replicación de esta cepa sean mucho menores que las cepas que si producen la degradación (VIC y WSN). Para estudiar esta posibilidad se decidió caracterizar la transcripción y replicación de las tres cepas. Para ello, se infectaron células HEK-293T con PR8, VIC o WSN y a distintas hpi se aisló RNA total celular que se utilizó para determinar los niveles de acumulación de RNA positivo y negativo por *Northern blot* con una sonda que detecta el segmento NP. En la **Figura 41 A** se observa que la acumulación del RNA de polaridad negativa (vRNA) con





**Figura 41. Niveles de acumulación del RNA viral positivo y negativo en células infectadas con las cepas VIC, WSN y PR8.**

Células HEK-293T se infectaron con las cepas PR8, VIC o WSN y a las hpi indicadas se aisló el RNA total que fue utilizado para detectar los RNAs de polaridad negativa (vRNA, gráfico de la izquierda) y positiva (mRNA, gráfico de la derecha) de la nucleoproteína viral por Northern blot. **B.** Extractos de las muestras de A a 10 hpi se utilizaron para analizar la presencia de la RNAP II (8WG16) y las demás proteínas indicadas por *Western blot*. M, células sin infectar; V, células infectadas con la cepa VIC; W, células infectadas con la cepa WSN; P, células infectadas con la cepa PR8.

la cepa VIC es mucho mayor que en el caso de PR8 y WSN, cepas con las que se tiene niveles prácticamente similares a lo largo de toda la infección. En cuanto al RNA de polaridad positiva (**Figura 41 B**), que como se explicó anteriormente es mayoritariamente mRNA, durante toda la infección los niveles con las tres cepas son similares. En la **Figura 41 C** se muestra la degradación de la forma hipofosforilada de la RNAP II, la acumulación de la nucleoproteína viral y la ausencia de cambios en la forma hiperfosforilada en Ser2, obtenidas a los tiempos finales de los experimentos anteriores. Los niveles similares de producción de mRNA viral por las distintas cepas, independientemente de su capacidad para inducir la degradación de la RNAP II, sugieren que el proceso de *cap-snatching per se* no activa el proceso de degradación de la RNAP II. Además, dado que las cepas WSN y PR8 tienen cinéticas y acumulan cantidades comparables de vRNA, es improbable que

la replicación del RNA viral tenga algún efecto sobre la proteólisis de la RNAP II.

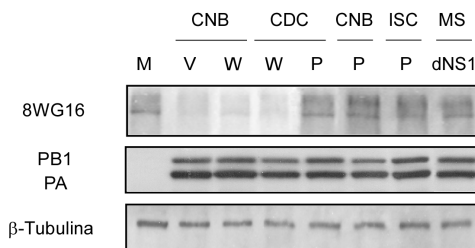
### 2.13.- Estudio de la capacidad de degradación de la RNAP II por distintas cepas de laboratorio del virus de la gripe

La incapacidad observada de PR8 para degradar la RNAP II puede no ser una característica general de esta cepa sino una adaptación adquirida por nuestro *stock* durante su historial de pases en el laboratorio. Por ello, se decidió estudiar el comportamiento de *stocks* provenientes de otros laboratorios para descartar esta posibilidad. Se infectaron células HEK-293T con las cepas de nuestro laboratorio VIC, WSN, PR8, las cepas WSN y PR8 del *Centers for Disease Control* de USA (CDC), la cepa PR8 del Instituto de Salud Carlos III de España (ISC) y un virus recombinantes rescatado en un entorno PR8 que no expresa la proteína NS1 (delNS1) (García-Sastre et al., 1998) del

Mount Sinai School of Medicine de USA. A las 15 hpi se recogieron extractos celulares que se utilizaron para analizar los niveles de acumulación de la forma hipofosforilada de la RNAP II,  $\beta$ -Tubulina y las proteínas virales PB1 y PA por *Western blot*. Como se muestra en la **Figura 42**, tanto la cepa WSN, independientemente de su laboratorio de origen, como VIC degradaron la RNAP II, mientras que ni el virus delNS1 ni ninguno de los stocks de diferentes laboratorios de PR8 fue capaz de inducir la degradación, sugiriendo que este comportamiento es una característica intrínseca de la cepa PR8 o de virus generados a partir de dicha cepa.

## 2.14.- Análisis de la capacidad de degradación de la RNAP II por la cepa vacunal A/Ann Arbor/6/60 cold-adapted

Se ha descrito que la cepa adaptada a multiplicarse a bajas temperaturas A/Ann Arbor/6/60 *cold-adapted* (AA) (Maassab, 1967) es avirulenta en humanos y distintos modelos animales como ratón, hámster, chimpances y hurones (Maassab, 1967, 1969; Maassab and Bryant, 1999; Snyder et al., 1985; Snyder et al., 1986). Diferentes genes virales (PA, PB1, PB2 y M) contribuyen de forma independiente a su fenotipo atenuado (Snyder et al., 1988; Snyder et al., 1985). Por estas razones, la cepa ha sido utilizada para producir vacunas con virus vivo generadas por *reassortment* de los seis genes internos de AA con los genes HA y NA de los virus circulantes (Chen et al., 2003a; Chen et al., 2003b; Chen et al., 2009; Joseph et al., 2008; Li et al., 1999; Suguitan et al., 2006). Debido a esta atenuación se decidió analizar si este virus puede degradar o no la RNAP II. Para ello, células de diferente



**Figura 42. Estudio de la capacidad de degradación de la RNAP II de distintas cepas de laboratorio del virus de la gripe.**

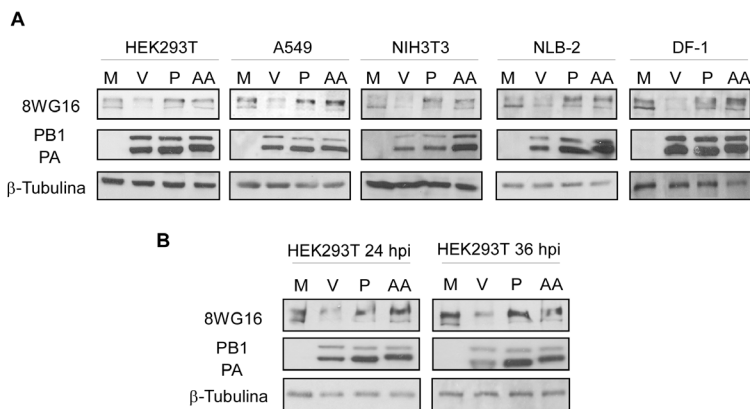
Se infectaron células HEK-293T con cepas de laboratorio de diferentes orígenes. A las 15 hpi se analizó por *Western blot* la forma hipofosforilada de la RNAP II (8WG16) y las proteínas indicadas. M, células sin infectar; V, células infectadas con la cepa VIC; W, células infectadas con la cepa WSN; P, células infectadas con la cepa PR8; dNS1, células infectadas con el virus PR8 recombinante que no expresa la proteína NS1. CNB, Centro Nacional de Biotecnología; CDC, Center for Disease Control; ISC, Instituto de Salud Carlos III; MS, Mount Sinai School of Medicine.

origen como humano (HEK-293T o A549), pollo (DF-1), ratón (NIH-3T3) y perro (NLB2) se infectaron a 33°C con AA o las cepas VIC y PR8 como controles. A las 15 hpi se recogieron extractos celulares y se analizaron los niveles de acumulación de la RNAP II por *Western blot*. Los resultados (**Figura 43 A**), muestran que mientras que la cepa VIC produce la degradación de la RNAP II, la infección con la cepa AA, al igual que con la otra cepa vacunal, PR8, no induce la degradación de la RNAP II, incluso a tiempo muy tardíos de infección (**Figura 43 B**). Estos resultados sugieren que la ausencia de degradación de la RNAP II está ligada a la atenuación de los virus de la gripe.

## 2.15.- Estudio de la capacidad de degradación de la RNAP II por diferentes aislados naturales del virus de la gripe

Tras haber caracterizado la capacidad de distintas cepas de virus de laboratorio para



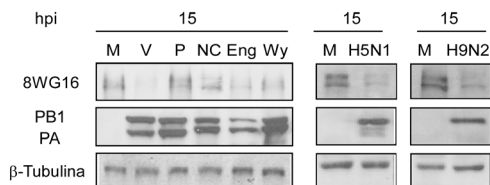


**Figura 43. Análisis de la capacidad de la cepa Ann Arbor para inducir la degradación de la RNAP II.**

**A.** Células HEK-293T, A549, NIH-3T3, NLB2 y DF-1 se infectaron con las cepas VIC, PR8 o A/Ann Arbor/6/60 *cold-adapted* (AA). A 15 hpi la presencia de la forma hipofosforilada de la RNAP II y las demás proteínas indicadas se analizó por *Western blot*. **B.** Se realizaron experimentos similares a los descritos en A con tiempos de infección mayores. M, células sin infectar; V, células infectadas con la cepa VIC; P, células infectadas con la cepa PR8, AA, células infectadas con la cepa Ann Arbor.

inducir la degradación de la RNAP II, se quiso analizar si esta degradación también era producida por aislados naturales del virus de la gripe. Para ello, se infectaron células HEK-293T con diferentes aislados humanos del subtipo H1N1 (A/England/1/51 y A/New Caledonia/20/99) o H3N2 (A/Wyoming/3/2003). La cepa A/England/1/51 (Isaacs and Andrewes, 1951) se eligió debido a su antigüedad con la finalidad de evaluar si la capacidad de degradar la RNAP II se adquirió recientemente o por el contrario es una característica presente en los virus de la gripe desde hace tiempo. En cuanto a las cepas A/New Caledonia/20/99 y A/Wyoming/3/2003, se las incorporó al estudio debido a que son cepas que han estado circulando en la población recientemente (Harper et al., 2004). Además, se utilizaron las cepas aviares A/Vietnam/1203/04 del subtipo H5N1, la cual fue aislada de humanos (Maines et al., 2005), siendo un aislado altamente patogénico que produce muy altos títulos en muchos órganos, incluyendo el cerebro

(Govorkova et al., 2005), y la cepa A/Turkey/Wisconsin/66 del subtipo H9N2 (Homme and Easterday, 1970), que fue analizada debido al potencial que virus de la gripe con dicho subtipo tienen para transmitirse a mamíferos (Butt et al., 2005; Cong et al., 2008; Gou et al., 2000; Guo et al., 1999; Lin et al., 2000; Peiris et al., 2001; Peiris et al., 1999). En todos los casos, la acumulación de la forma hipofosforilada de la RNAP II,  $\beta$ -Tubulina y las subunidades de la polimerasa viral PB1 y PA se analizaron a las 15 hpi por *Western blot*. Como se observa en la **Figura 44**, tanto las cepas humanas como las aviares analizadas inducen la degradación de la RNAP II en niveles similares a VIC. La progresión de la infección se midió mediante la acumulación de PB1 y PA y hay que destacar que la subunidad PA en el caso de las cepas aviares es casi indetectable, probablemente debido a la ausencia en la proteína de estas cepas de los epítomos reconocidos por la mezcla de anticuerpos monoclonales utilizados.



**Figura 44. Estudio de la capacidad de degradación de la RNAP II de distintos aislados naturales del virus de la gripe.**

Se infectaron células HEK-293T con aislados naturales del virus de la gripe. A las 15 hpi se analizó por *Western blot* la forma hipofosforilada de la RNAP II (8WG16) y las proteínas indicadas. M, células sin infectar; V, células infectadas con la cepa VIC; P, células infectadas con la cepa PR8; NC, células infectadas con la cepa A/New Caledonia/20/99; Eng, células infectadas con la cepa A/England/1/51; Wy, células infectadas con la cepa A/Wyoming/3/2003; H5N1, células infectadas con la cepa A/Vietnam/1203/04 y H9N2, células infectadas con la cepa A/Turkey/Wisconsin/66.

Estos resultados apoyan la noción de que la degradación de la RNAP II es una característica general de los virus de la gripe tipo A patogénicos.

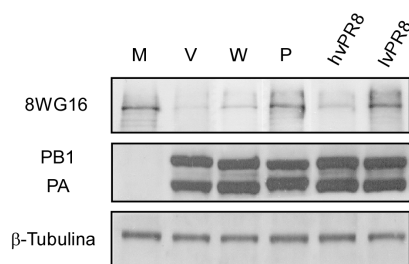
## 2.16.- Estudio de la relación entre la capacidad de degradación de la RNAP II y la patogenicidad viral

Recientemente, durante la búsqueda en una librería de virus PR8 pasados en laboratorio se identificó un aislado con fenotipo altamente patogénico que incluye un rápido crecimiento en células en cultivo y alta patogenicidad en ratones Mx<sup>+/+</sup> (Grimm et al., 2007). Por lo tanto, se decidió comparar el comportamiento en cuanto a la degradación de la RNAP II de este virus PR8 altamente patogénico (hvPR8) con un virus PR8 *wild-type* aislado en el mismo estudio que fue descrito como de baja patogenicidad (lvPR8) y con los virus de laboratorio VIC, WSN y PR8 utilizados anteriormente. Para ello se infectaron células HEK-293T y se analizó la capacidad de degradación tras

15 hpi. En las células infectadas con el virus hvPR8 se observa una degradación de la RNAP II similar a la producida por las cepas VIC y WSN, mientras que la infección con el virus lvPR8, al igual que la cepa PR8, no induce degradación (**Figura 45**) pese a tener niveles de acumulación de proteínas virales similares a los virus que sí degradan la RNAP II. Estos resultados indican que la degradación del principal componente de la maquinaria de transcripción celular, la subunidad mayor de la RNAP II, es un proceso inducido por las cepas patogénicas del virus de la gripe.

## 2.17.- Generación de virus recombinantes con intercambio del segmento de PA entre las cepas VIC, WSN y PR8

Como se describió anteriormente, se conoce que la subunidad PA de la polimerasa, tanto de cepas aviares como humanas, induce proteólisis (Naffakh et



**Figura 45. Análisis de la capacidad de inducir la degradación de la RNAP II de virus PR8 de alta y baja patogenicidad.**

Se infectaron células HEK-293T con las cepas VIC, WSN, PR8 y aislados de PR8 de alta y baja patogenicidad. A las 15 hpi se analizó por *Western blot* la forma hipofosforilada de la RNAP II (8WG16) y las proteínas indicadas. M, células sin infectar; V, células infectadas con la cepa VIC; W, células infectadas con la cepa WSN; P, células infectadas con la cepa PR8; hvPR8, células infectadas con el aislado altamente virulento de PR8; lvPR8, células infectadas con el aislado de baja virulencia de PR8.

al., 2001; Sanz-Ezquerro et al., 1995), siendo el tercio amino-terminal de la proteína el responsable de dicha actividad (Sanz-Ezquerro et al., 1996). También se sabe que una mutación puntual en el aminoácido 157 reduce significativamente dicha actividad (Perales et al., 2000) y, como se mostró en el apartado 2.7 de esta sección, un virus recombinante que expresa una proteína PA que lleva dicha mutación presenta un retraso en la cinética de degradación de la RNAP II. Además, se ha demostrado que la subunidad PA de la cepa PR8, al ser expresada individualmente desde plásmidos, presenta una actividad proteolítica similar a la de la proteína PA de la cepa VIC, pero dicha actividad es mucho menor a bajas temperaturas (Naffakh et al., 2001). Por otro lado, y como se demostró en el apartado 2.8 de esta sección, a diferencia de las cepas VIC y WSN, la cepa PR8 es incapaz de inducir la degradación de la RNAP II. Todos estos datos hacen suponer que la subunidad PA de la polimerasa viral tiene un papel importante en la degradación de la RNAP II que se observa durante la infección por el virus de la gripe, por lo que en el laboratorio se decidió analizar dicha implicación. Con este fin se decidió rescatar virus recombinantes de las cepas VIC, WSN y PR8 intercambiando los segmentos que codifican la proteína PA entre las cepas que degradan la RNAP II y la que no lo hace. Esto se realizó de acuerdo a como se describe en el apartado 9.5 de Materiales y Métodos y el origen de la composición génica de los virus rescatados se muestra en la **Tabla VI**.

Todos los virus se rescataron con los genes NA y HA de la cepa WSN debido a que, por un lado, la proteína NA de esta

cepa carece de un sitio de glicosilación en la posición 130 que la hace independiente de la utilización de tripsina para permitir la liberación de los viriones de la célula infectada (Li et al., 1993). Esto facilita técnicamente el rescate al no ser necesario agregar dicha proteasa al medio celular durante el co-cultivo de las células HEK-293T, que son extremadamente sensibles a la tripsina, con las células MDCK. Por otro lado, la cepa VIC es incapaz de infectar ratones, por lo que se decidió introducir el gen HA de WSN en los virus recombinantes de la cepa VIC para permitir, en caso de ser necesarios, la infección de ratones con dichos virus. Además, ya que tanto WSN como PR8 son cepas del subtipo H1N1 y por lo tanto expresan una proteína HA similar, los virus recombinantes en entorno PR8 también se rescataron con el gen HA de la cepa WSN para que todos los virus expresaran las mismas proteínas HA y NA y así evitar posibles diferencias en el comportamiento debido a las diferencias en las glicoproteínas de membrana. Finalmente, los virus rescatados en entorno VIC presentaban deficiencias en la formación de placa y crecían a unos títulos aproximadamente 100 veces menores que los virus rescatados en entorno WSN y PR8 (datos no mostrados). Teniendo en cuenta que en los viriones las proteínas HA y NA se encuentra interaccionando con la proteína M, supusimos que los problemas presentados por los virus rescatados en entorno VIC se podrían deber a deficiencias en la interacción entre la proteína M de origen VIC y las glicoproteínas de membrana de origen WSN ya que las proteínas HA y NA de la cepa VIC son del subtipo H3N2. Por ello, los virus recombinantes de la cepa VIC se

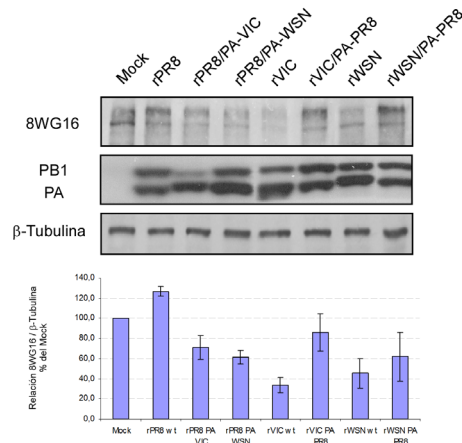
Virus recombinante	Plásmidos transfectados
rPR8 wt	PR8 <sub>1, 2, 3, 5, 7, 8</sub> WSN <sub>4, 6</sub>
rPR8 PA Vic	PR8 <sub>1, 2, 5, 7, 8</sub> WSN <sub>4, 6</sub> VIC <sub>3</sub>
rPR8 PA WSN	PR8 <sub>1, 2, 5, 7, 8</sub> WSN <sub>3, 4, 6</sub>
rVic wt	VIC <sub>1, 2, 3, 5, 7, 8</sub> WSN <sub>4, 6</sub>
rVic PA PR8	VIC <sub>1, 2, 5, 7, 8</sub> WSN <sub>4, 6</sub> PR8 <sub>3</sub>
rWSN wt	WSN <sub>1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8</sub>
rWSN PA PR8	WSN <sub>1, 2, 4, 5, 6, 7, 8</sub> PR8 <sub>3</sub>

**Tabla VI.** Segmentos genómicos utilizados para el rescate de los distintos virus recombinantes. En rojo se muestran los segmentos 3 que producen el intercambio de la proteína PA. 1.- Segmento PB2; 2.- Segmento PB1; 3.- Segmento PA; 4.- Segmento HA; 5.- Segmento NP; 6.- Segmento NA; 7.- Segmento M; 8.- Segmento NS.

volvieron a rescatar, pero en este caso con el gen M de la cepa WSN. Estos nuevos virus se comportaron, tanto en formación de placa como en título alcanzado, de forma similar que los virus rescatados en entorno WSN y PR8 (datos no mostrados).

## 2.18.- Estudio de la implicación de la subunidad PA de la polimerasa viral en la degradación de la RNAP II

Una vez generados los distintos virus recombinantes, se procedió a analizar el comportamiento de los mismos en cuanto a la inducción de la degradación de la subunidad mayor de la RNAP II. Para ello, se infectaron células HEK-293T con cada uno de los virus y a las 15 hpi se recogieron extractos celulares que se analizaron por *Western blot*. Como se observa en la **Figura 46**, todos los virus *wild-type* se comportan como era de esperar, esto es, mientras que el virus rPR8 wt no produce degradación de la RNAP II, aunque si se observa el *band shift* típico, los virus rVIC wt y rWSN wt sí degradan la RNAP II. En cuanto a los virus con intercambio del gen



**Figura 46.** Análisis de la implicación de la subunidad PA en la degradación de la RNAP II.

Células HEK-293T fueron infectadas con los virus recombinantes con intercambio del segmento que expresan la proteína PA entre las cepas PR8, VIC y WSN y a las 15 hpi la forma hipofosforilada de la RNAP II (8WG16) y las proteínas indicadas se analizaron por *Western blot*. En el gráfico inferior se muestra la cuantificación de los niveles de la RNAP II hipofosforilada. Estos experimentos se realizaron tres veces y se muestran las medias y desviaciones estándar.

de PA, todos se comportan de acuerdo a lo pronosticado, aunque con un fenotipo intermedio, esto es, los virus rPR8 PA VIC y rPR8 PA WSN inducen el *band shift* característico de los virus PR8 pero además producen una ligera degradación de la RNAP II. Por otra parte, tanto el virus rVIC PA PR8 como el virus rWSN PA PR8, casi no producen degradación de la RNAP II, y muestran una considerable inducción del *band shift* desde la banda de mayor movilidad electroforética a la de menor movilidad. Estos resultados indican que la subunidad PA de la polimerasa del virus de la gripe está implicada en la degradación de la forma hipofosforilada de la RNAP II, y que además se necesita del aporte de alguna de las otras subunidades para que este proceso se lleve a cabo completamente.











El virus de la gripe es un parásito intracelular obligado y por lo tanto necesita desarrollar su ciclo vital en el interior de la célula. Por ello ha seleccionado mecanismos que le permiten hacerse con el control de muchos procesos celulares en su propio beneficio. De esta forma es capaz de regular la expresión génica tanto celular como viral. Los principales procesos para la expresión génica del virus y la producción de progenie, la transcripción y replicación del RNA viral, se realizan en el núcleo de la célula infectada y están íntimamente ligados a la maquinaria de transcripción celular (Engelhardt et al., 2005; Jackson et al., 1982; Spooner and Barry, 1977), por lo que el estudio de los efectos que esta relación tiene tanto para el virus como para la célula son fundamentales.

## 1.- ESTUDIO DE LA RELEVANCIA FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA CELULAR hCLE EN LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA GRIPE

La adaptación del virus de la gripe a un nuevo hospedador esta ligado a las interacciones entre la polimerasa viral y componentes de la célula hospedadora, a los que el virus necesita adaptarse para un óptimo crecimiento. Sabemos que hCLE interacciona con la maquinaria de transcripción celular, mas precisamente con la subunidad mayor de la RNAP II (Pérez-González et al., 2006), con las subunidades de la polimerasa viral PA (Huarte et al., 2001) y PB2 (Pérez-González, 2007) y que co-purifica con RNPs virales activas reconstituidas *in vivo* (Huarte et al., 2001). Por otro lado, recientemente dos grupos resolvieron la

estructura atómica del tercio N-terminal de PA y determinaron que en el existe una actividad endonucleasa (Dias et al., 2009; Yuan et al., 2009). Se ha propuesto por tanto que esta actividad sería utilizada en el proceso de *cap-snatching*, contrariamente a lo anteriormente propuesto en que se pensaba que la actividad endonucleasa residia en la subunidad PB1 (Li et al., 2001). La interacción de hCLE con los factores implicados en el proceso de *cap-snatching*, hacen posible imaginar que esta proteína tenga un papel en dicho proceso. Además, se ha descrito que una mutación puntual en el residuo 510 de PA (H510A) afecta la actividad de transcripción de la polimerasa viral sin tener consecuencias en la actividad replicativa. Es más, el principal defecto observado se encuentra en la actividad endonucleasa de la polimerasa (Fodor et al., 2002). Lo interesante de está mutación es que, a diferencias de otras mutaciones en el N-terminal de PA que se han descrito que afectan la actividad endonucleolítica (Hara et al., 2006), no se encuentra en la región de PA que se ha descrito que tiene actividad nucleasa y estructura muy parecida a las nucleasas de tipo II. Por el contrario, dicha mutación se encuentra dentro de una de las regiones de PA que interaccionan con hCLE (Huarte et al., 2001), lo que abre la posibilidad de que el defecto en la actividad endonucleolítica de dicho mutante se debe a una nula o escasa interacción con hCLE.

En este contexto de interacciones entre proteínas virales y celulares, es tentador pensar que hCLE podría ser un factor implicado en la determinación del rango de hospedador. Sin embargo, esta proteína parece ser evolutivamente muy

conservada ya que se hallaron homólogos en otro mamíferos como en mono Reshus (Gibbs et al., 2007), chimpancé (Mikkelsen et al., 2005), rata (Gibbs et al., 2004), cerdo, perro (Lindblad-Toh et al., 2005) y caballo durante la secuenciación de dichos genomas, y también en especies mas alejadas evolutivamente como en pollo (Hillier et al., 2004), el marsupial colicorto (Mikkelsen et al., 2007), el escarabajo rojo de la harina (Richards et al., 2008) o el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Lai et al., 2000). Esta conservación hace difícil pensar que hCLE sea un determinante del rango de hospedador ya que se encontraría presente en las principales especies que son infectadas por el virus de la gripe. Por el contrario, justamente dicha conservación podría hacer que hCLE tenga un papel importante en el ciclo infectivo del virus de la gripe, ya que sería una interacción con la que el virus siempre contaría, independientemente del hospedador. Sería interesante analizar si hCLE o sus homólogos interactúan con las subunidades de las polimerasas de otros Orthomyxovirus, ya que de ser así, la interacción entre hCLE o sus homólogos y las polimerasas de los Orthomyxovirus podría ser una diana para el desarrollo de antivirales de amplio espectro.

### 1.1.- Efecto de la proteína celular hCLE sobre la expresión génica del virus de la gripe

La función de hCLE en la transcripción celular nos hizo pensar que podría tener una función en la expresión génica viral y por ello se analizó la actividad de RNPs recombinantes reconstituídas *in vivo* en condiciones de silenciamiento de hCLE, observando que la actividad de las mismas

es aproximadamente un 40% menor en condiciones de silenciamiento (**Figura 17**). Debido a que solamente se midió la acumulación de la proteína CAT, lo cual es el resultado de distintos procesos como la replicación y transcripción del RNA molde, el transporte del mRNA del núcleo al citoplasma y la traducción del mismo, se sabe que hay un defecto en la expresión génica viral al silenciar hCLE, pero no se puede determinar cual es el proceso afectado. La bajada de actividad podría deberse a efectos en varios o todos los pasos de la expresión génica o en algún paso en particular. Por ejemplo, se ha descrito que el virus no solo requiere la actividad de la RNAP II como proveedora de sustratos para el *cap-snatching*, sino también para facilitar el transporte del núcleo al citoplasma de los mRNAs virales (Amorim et al., 2007). Teniendo en cuenta que el silenciamiento de hCLE disminuye en un 50% la actividad de la RNAP II (Pérez-González et al., 2006), el efecto que observamos en la reconstitución de RNPs podría deberse a que se está afectando el transporte del mRNA de CAT. También podría ser que el paso afectado fuera la traducción ya que se ha observado la presencia de hCLE en purificaciones de hStaufen-1 (P. Villacé, datos no publicados), una proteína implicada en el transporte de mRNA y su traducción localizada (Kiebler and DesGroseillers, 2000; Kiebler et al., 1999; Kohrmann et al., 1999; Tang et al., 2001). Es mas, trabajos de distintos grupos han identificado la presencia de hCLE en complejos ribonucleoproteicos de transporte de mRNA (Elvira et al., 2006; Kanai et al., 2004) y en uno de ellos se observó que hCLE interactúa de forma independiente de RNA con el factor de

elongación de la traducción EF-1 $\alpha$  (Kanai et al., 2004).

Con la reconstitución de RNPs *in vivo* se establece un sistema de transcripción-replicación viral transitorio que permite estudiar la expresión génica viral sin tener en cuenta otros procesos que tienen lugar durante la infección. Sin embargo, justamente debido a esto, puede no reflejar completamente lo que ocurre durante la infección. En este contexto, es llamativo que tanto en la síntesis (**Figura 18**) como en la acumulación de proteínas virales (**Figura 19**) no se observen diferencias entre células con hCLE silenciada o sin silenciar. Sin embargo, esto puede ser una consecuencia del aumento en los niveles de acumulación de hCLE que se observa durante la infección (**Figura 23**), cuya consecuencia podría ser que, salvo en las etapas iniciales, la infección de células con hCLE silenciada no se realicen en condiciones de disminución de la disponibilidad de esta proteína.

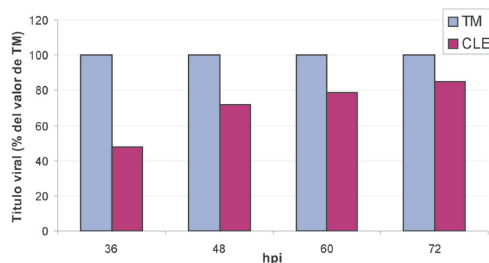
### 1.2.- Efecto de la proteína celular hCLE sobre la producción de partículas virales

El ciclo viral, una vez se ha producido la replicación del RNA y la expresión génica, se completa con el transporte de las RNPs progenie a la membrana celular para su encapsidación en las nuevas partículas virales que son liberadas por la célula infectada. Teniendo en cuenta esto, analizamos la producción de partículas virales al silenciar hCLE para tener una visión completa de lo ocurrido durante la infección. Se observó que a tiempos tardíos de un solo ciclo de infección, el título viral disminuyó tres veces al comparar las células silenciadas con las

sin silenciar (**Figura 20**). Esta diferencia puede parecer escasa, pero se obtuvieron resultados similares al utilizar péptidos que interfieren en la formación del complejo de la polimerasa viral (Ghanem et al., 2007) o siRNAs específicos para alguna de las subunidades de la polimerasa viral (Ge et al., 2003). Es más, en el laboratorio, al rescatar un virus cuyas RNPs solo mantienen un 25% de la capacidad de síntesis de cRNA, los títulos obtenidos disminuyeron solo 10 veces con respecto al virus *wild type* (Huarte et al., 2003). También se han observado disminuciones de los títulos virales en torno a 5 veces al silenciar otros factores celulares (Honda et al., 2007; Naito et al., 2007a). Si pensamos que la escasa capacidad codificante de los virus en general, y de los que tienen genoma RNA en especial, los lleva a una dependencia extrema de los componentes celulares, no sería de extrañar que las proteínas virales establezcan interacciones redundantes con distintos factores celulares que les permitan asegurar la viabilidad viral. Por ejemplo, el virus podría tener acceso a la RNAP II a través de la interacción con hCLE, pero podría conseguir esto mismo mediante su interacción con la DNA helicasa MCM o el remodelador de cromatina CHD6. Esta redundancia de interacciones haría que la pérdida de uno de ellos no tenga consecuencias fatales para la viabilidad del virus sino que produzca solo un pequeño efecto en su ciclo vital.

Si consideramos los experimentos de múltiples ciclos como una sucesión de infecciones de un solo ciclo, sería esperable observar que las diferencias en los títulos obtenidos en células con hCLE silenciada y sin silenciar deberían ir incrementándose

con el tiempo. Al realizar este tipo de experimentos también se observa una menor producción de partículas infecciosas en las células con hCLE silenciada con respecto al control sin silenciar (**Figura 22**). Sin embargo, a medida que avanza el tiempo de infección parece haber una progresiva disminución en la diferencia de los títulos obtenidos entre las células silenciadas y sin silenciar (**Figura 47**), lo que podría indicar que, ya sea por pérdida del silenciamiento o por alguna otra razón, en cada nuevo ciclo de infección en las células con hCLE silenciada, el virus encuentra mejores condiciones para llevar a cabo su ciclo infectivo. Una posible explicación sería que la respuesta antiviral que se establece en las células que todavía no han sido infectadas, como respuesta al IFN liberado al medio de cultivo por las células infectadas, tenga como consecuencia una disminución de la actividad del sistema de silenciamiento celular, lo que poco a poco permitiría a las células silenciadas reestablecer los niveles de hCLE. De la misma forma, podría ser que el aumento que se observa en los niveles de acumulación de hCLE durante la infección (**Figura 23**) no fuera inducido por el virus sino por la defensa antiviral de la célula. En este sentido, hay que recordar que hCLE modula positivamente la actividad de la RNAP II, la cual está implicada en la expresión de los genes de IFN en el caso de las células infectadas y de los genes de respuesta a IFN (IGRs) en las células vecinas, por lo que su sobre-expresión durante la infección podría ser debido a una necesidad de las células para desarrollar la respuesta antiviral. Si cualquiera de estas dos posibilidades fuera correcta, la consecuencia sería que



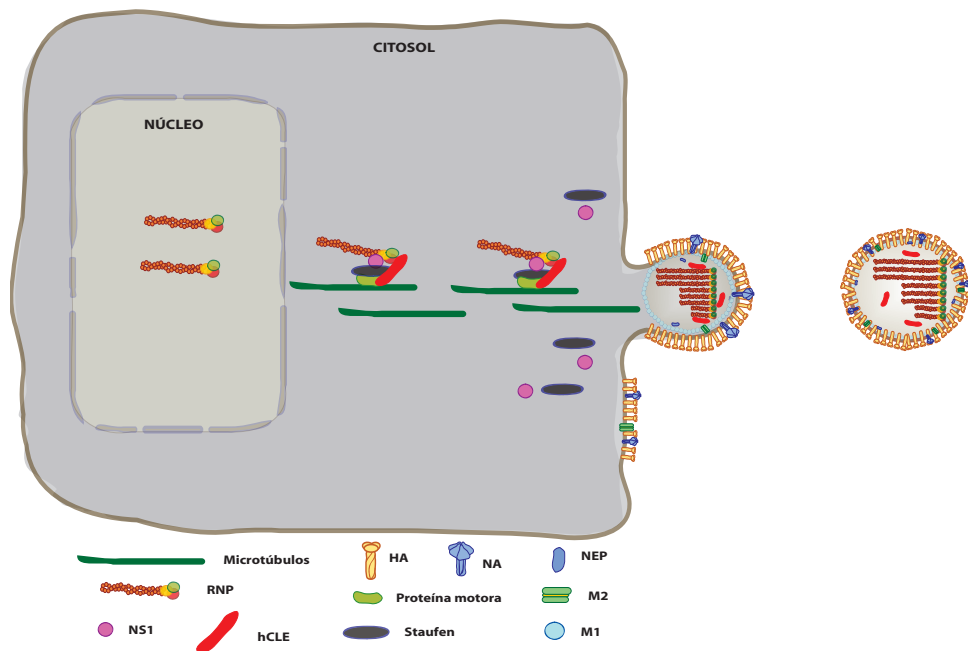
**Figura 47. Producción de virus en múltiples ciclos en células con hCLE silenciada.**

Se representan los títulos virales de la **Figura 22** tomando a cada tiempo el valor de las células sin silenciar (TM) como referencia para el cálculo de las células silenciadas (CLE).

en un cultivo infectado a baja multiplicidad de infección, las células que no se infectan durante el primer ciclo de infección sino en los siguientes, tendrían mayores cantidades de hCLE, lo que favorecería la expresión génica del virus y por consiguiente la producción de partículas.

### 1.3.- Incorporación de la proteína celular hCLE en viriones del virus de la gripe

Además de las posibilidades expresadas anteriormente para explicar el aumento de los niveles de acumulación de hCLE durante la infección (**Figura 23**), lo mas lógico es pensar que este es un proceso inducido por el virus para satisfacer la necesidad de este factor celular a tiempos tardíos de infección. Esto se ve apoyado por el análisis mediante inmunomicroscopía electrónica de cortes ultrafinos de células infectadas, en los que se observa que la proteína hCLE se encuentra en viriones del virus de la gripe que están siendo liberados de las células infectadas (**Figura 24**), aunque en un estudio proteómico de partículas del virus de la gripe realizado recientemente no se halló hCLE presente en las mismas (Shaw et al., 2008). Sin embargo, en experimentos muy recientes



**Figura 48. Modelo del transporte de las RNPs y la morfogenénesis viral. Implicación de NS1, hStaufen-1 y hCLE.**

Se muestra esquemáticamente el modelo en el que participarían las proteínas NS1, hStaufen y hCLE. hCLE se incorpora en el virión mientras que NS1 y hStaufen se liberan de las RNPs antes de que se forma la partícula viral, quedando por lo tanto en el citoplasma celular.

en nuestro laboratorio se ha observado que hCLE co-sedimenta con viriones del virus de la gripe (detectados por la presencia de NP y M1) en gradientes de sacarosa (datos no publicados).

permitido detectar la presencia de hCLE en viriones purificados por *Western blot*. En este contexto, hCLE podría estar implicada en la morfogenénesis de los viriones. Teniendo en cuenta la interacción de hCLE con PA y PB2, se podría pensar que su sobre-expresión se debe a que es un factor necesario para el transporte de las RNPs progenie a la membrana celular para su encapsidación en los viriones. Además, como ya se mencionó anteriormente, hCLE se encuentra en purificaciones de la proteína hStaufen-1 (P. Villacé, datos no publicados), una proteína que se encuentra implicada en

la morfogenénesis del virus HIV-1 (Chatel-Chaix et al., 2004; Mouland et al., 2000), la cual además de interactuar con NS1 (Falcón et al., 1999) también lo hace con las vRNPs y se cree que podría estar implicada en la morfogenénesis viral (S. de Lucas, resultados no publicados). Es más, estudios de Garaigorta y colaboradores indican que NS1 podría tener un papel en eventos tardíos de la morfogenénesis del virus de la gripe. Todos estos datos juntos hacen pensar en un modelo en el cual interacciones entre las vRNPs, NS1, hCLE y hStaufen-1 sean las encargadas del transporte de las vRNPs hacia la membrana plasmática y/o la encapsidación de las mismas en los viriones (**Figura 48**). Por otra parte, y a diferencia de hCLE, ni hStaufen-1 ni NS1 se ha visto que se incorporen en los viriones, por lo que las

mismas en algún paso de la formación de la partícula deberían liberarse de las vRNPs, mientras hCLE quedaría unida a las mismas y se incorporaría en los viriones. Además, Regan y colaboradores han descrito mutaciones en la subunidad PA de la polimerasa viral que elimina completamente la formación de partículas virales (Regan et al., 2006). Llamativamente, las mutaciones se encuentran en los residuos 507 y 508 de PA, dentro de una de las regiones de interacción con hCLE (Huarte et al., 2001), por lo que si estos mutantes fueran defectivos en la interacción con hCLE se reforzaría el modelo propuesto por el cual ésta proteína estaría implicada en la morfogénesis viral. También es posible una visión más sencilla en la cual el aumento de los niveles de acumulación de hCLE durante la infección no tenga ninguna efecto en la infección de esa célula, sino que lo importante sea la incorporación en los viriones para que, al infectar la siguiente célula, ayude en el transporte al núcleo de las RNPs paternas y/o en la transcripción primaria.

#### 1.4.- Efectos pleiotrópicos de hCLE en la infección por el virus de la gripe

Tanto de los datos sobre las distintas actividades celulares de hCLE en el núcleo y en el citoplasma celular obtenidos en el laboratorio (Pérez-González, 2007; Pérez-González et al., 2006) como de los distintos puntos discutidos anteriormente, se desprende la posibilidad de que durante el ciclo viral hCLE cumpla distintas funciones dependiendo del compartimiento celular, y tal vez del momento del ciclo infectivo, en que se encuentre. La fracción nuclear de hCLE podría estar implicada en la regulación de la expresión génica viral mientras que

la fracción citoplasmática podría actuar en el transporte y empaquetamiento de las RNPs en los viriones progenie. También la proteína hCLE presente en los distintos gránulos de transporte de mRNAs en el citoplasma podría estar implicada en la traducción viral. Aunque ya se había descrito la capacidad de hCLE de interactuar con ella misma (Howng et al., 2004), recientemente en el laboratorio hemos observado la presencia en distintos tipos de células de homo-oligómeros de hCLE, especialmente dímeros. Además, hemos observado que los monómeros y los dímeros de hCLE se encuentran formando parte de distintos complejos celulares (A. Pérez-González, datos no publicados). Es tentador pensar que exista una correlación entre las distintas formas de auto-asociación y la localización de hCLE, y que esto tenga implicación en la función de la proteína, tanto a nivel celular como durante la infección.

Finalmente, hCLE también se ha encontrado asociada a la polimerasa del único otro virus RNA no perteneciente a la familia *Orthomyxoviridae* con ciclo de transcripción y replicación nuclear, el virus de la enfermedad de Borna o *Borna Disease Virus* (BDV) mediante estudios proteómicos posteriormente validados bioquímicamente (JC de la Torre, datos no publicados). Aunque los mRNAs de este virus contienen estructuras cap en su extremo 5' y son poliadenilados en su extremo 3', aparentemente el proceso de transcripción es distinto al del virus de la gripe y no implica un paso de *cap-snatching* ya que las secuencias en el extremo 5' son homogéneas y codificadas por el virus (revisado en (de la Torre, 2002)). Pese a estas diferencias, es llamativo que en



miembros de las únicas familias de virus RNA cuyos procesos de síntesis de RNA se realizan en el núcleo, las polimerasas virales se asocian a una misma proteína celular que tiene un importante papel en la transcripción celular, lo que podría estar indicando la existencia de un mecanismo común en ambos virus o que los virus de replicación nuclear, al menos los de genoma RNA, tengan una alta dependencia de este factor.

## 2.- ESTUDIO DEL EFECTO QUE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA GRIPE TIENE SOBRE LA MAQUINARIA DE TRANSCRIPCIÓN CELULAR

Muchos virus establecen interacciones entre alguno de sus componentes y elementos de la maquinaria de transcripción celular (Ammosova et al., 2005; Cujec et al., 1997b; Durand et al., 2005; Huarte et al., 2001; Kawaguchi and Nagata, 2007; Vogt et al., 2008; Wei et al., 1998) o la RNAP II (Cujec et al., 1997a; Cujec et al., 1997b; Dai-Ju et al., 2006; Deng et al., 2002; Greco-Stewart et al., 2007; Zhou and Knipe, 2002). Estas asociaciones producen cambios en la maquinaria de transcripción que han sido ampliamente documentadas. Por ejemplo, Poliovirus corta e inactiva el factor de transcripción TBP (TATA-binding protein) (Clark et al., 1993), HIV produce una hiper-fosforilación de la Ser5 del CTD de la RNAP II (Deng et al., 2002; Isel and Karn, 1999; Zhou et al., 2000), Citomegalovirus también induce la fosforilación del CTD (Baek et al., 2004; Tamrakar et al., 2005), el virus Epstein-Barr induce la fosforilación de la Ser5 del CTD (Bark-Jones et al., 2006), Adenovirus

también produce una hiper-fosforilación del CTD de la RNAP II (Ohrmalm and Akusjarvi, 2006) y el virus Hespes Simplex tipo 1 induce la degradación proteosomal de la forma fosforilada en Ser2 de la RNAP II (Dai-Ju et al., 2006; Fraser and Rice, 2005, 2007). El virus Bunyamwera inhibe la fosforilación de la Ser2 (Thomas et al., 2004), lo que sugiere un bloqueo de la transcripción celular en la transición desde iniciación a elongación. La transcripción del virus Bunyamwera depende de los mRNAs celulares ya que, al igual que el virus de la gripe, obtiene la estructura cap de sus mensajeros por un proceso de cap-snatching. Sin embargo, debido a su replicación citoplasmática, se ha postulado que el virus no necesita una síntesis activa de mRNA ya que los mRNAs citoplasmáticos serían suficientes para suministrar las estructuras cap que el virus necesita para la síntesis de sus propios mRNAs (Elliott, 1999).

### 2.1.- Efecto de la infección por el virus de la gripe sobre la maquinaria de transcripción celular

A diferencia del virus Bunyamwera, la expresión génica del virus de la gripe es dependiente de la actividad de la RNAP II (Lamb and Choppin, 1977; Spooner and Barry, 1977). Esto es consecuencia de que la polimerasa viral utiliza estructuras cap de los pre-mRNAs celulares que están siendo sintetizados activamente como *primers* para la síntesis de sus propios mensajeros (Plotch et al., 1979; Plotch et al., 1981). De acuerdo con esta dependencia funcional, se ha descrito una asociación de la polimerasa viral con las formas hipofosforilada y fosforilada en Ser5 de la RNAP II (Engelhardt et

al., 2005). Teniendo en cuenta esta información junto con la interacción entre hCLE, un modulador positivo de la actividad de la RNAP II, y las subunidades de la polimerasa PA y PB2, se analizó si la infección por el virus de la gripe inducía cambios en la maquinaria de transcripción celular. Utilizando anticuerpos que reconocen el CTD de la subunidad mayor de la RNAP II, se observó que durante la infección se produce una disminución en los niveles de acumulación de la forma hipofosforilada de la RNAP II, mientras que las formas hiperfosforiladas en Ser5 y Ser2 no se ven afectadas (**Figura 26 A**). Debido a que esta disminución también se observó al utilizar un anticuerpo que reconoce el N-terminal de la subunidad mayor de la RNAP II (**Figura 26 B**), se puede descartar que esté ocurriendo una pérdida de reactividad de los epítomos del CTD o que se haya degradado sólo dicho dominio. Por el contrario, el hecho de que la vida media de la subunidad mayor de la RNAP II sea superior al tiempo al que durante la infección se observa la desaparición de la RNAP II (**Figura 26 C**) sugiere que lo que está ocurriendo es una degradación de la forma hipofosforilada de la RNAP II. Además, las formas hipo e hiperfosforiladas de la RNAP II provienen de un mismo mRNA y tienen vida media similar (datos no mostrados), lo que descarta que la desaparición de la forma hipofosforilada se deba a un defecto en la transcripción de su mensajero o sea consecuencia del *shut-off* producido por el virus. Esto se ve reforzado por el hecho de que el virus recombinante que expresa una PA mutante con menor actividad proteolítica (PA157A), pero que induce un *shut-off* celular similar al virus *wild*

*type* (Huarte et al., 2003), tiene un retraso en la degradación de la RNAP II (**Figura 36**). Por otra parte, en el laboratorio se ha observado que la infección por el virus de la gripe tiene el mismo efecto sobre los niveles de acumulación de la proteína CHD6 (R. Alfonso, datos no publicados), un remodelador de cromatina que colocaliza con las formas hipofosforilada y fosforilada en Ser5 de la RNAP II (Lutz et al., 2006) e interacciona con la polimerasa viral (R. Alfonso, datos no publicados). Esto podría indicar que el virus, durante el proceso de *cap-snatching*, además de cortar el extremo 5' cap del pre-mRNA naciente, produce la degradación de los componentes de la maquinaria de transcripción celular. En este sentido, el hecho de que tanto la actividad endonucleolítica como la capacidad de proteólisis se encuentren en el N-terminal de PA podría favorecer que dichos procesos sean simultáneos. Por ejemplo, una vez la polimerasa viral ha realizado el proceso de *cap-snatching*, podría utilizar esta proteólisis de los componentes de la maquinaria de transcripción celular para “liberarse” de los mismos y poder trasladar el mRNA viral que está sintetizando a la membrana nuclear para su exportación al citoplasma. Esta degradación debería ser selectiva ya que al contrario que lo observado con la RNAPII y CHD6, los niveles de acumulación de otros componentes de la maquinaria de transcripción celular, como las ciclinas T1 y Cdk7 no disminuyen durante la infección.

Es esperable que la degradación de la RNAP II tenga consecuencias en la síntesis de mRNAs. Efectivamente, en los tiempos de infección en los que comienza la degradación de la RNAP II,



se observa una disminución en la síntesis de RNA debida a la actividad de la RNAP II (**Figura 31**). Esta disminución en la síntesis tanto general (**Figura 31 A**) como de mRNAs de genes específicos (**Figura 31 B**) está de acuerdo con resultados de Chan y colaboradores, quienes observaron mediante experimentos de inmunoprecipitación de cromatina que la RNAP II se encuentra asociada por igual a las regiones promotoras de genes en células infectadas y sin infectar, mientras que hay una reducción en la densidad de ocupación de regiones codificantes de genes transcritos por la RNAP II en células infectadas (Chan et al., 2006), lo cual sugiere que el virus de la gripe interfiere con el proceso de elongación de la transcripción celular pero no con la iniciación. Parecería contradictorio que el virus inhiba y degrade la RNAP II cuando su transcripción depende de la actividad de esta enzima. Sin embargo, el virus está permitiendo que haya iniciación de la transcripción y *capping*, procesos que generan transcritos de entre 20 y 50 nucleótidos con estructura cap en su extremo 5' (Jove and Manley, 1984; Rasmussen and Lis, 1993), lo cual es suficiente para obtener los oligonucleótidos que utiliza como *primers* para la síntesis de los mRNAs virales. Además, la inhibición de la síntesis mediada por la RNAP II no llega a ser total (**Figura 31 A**), por lo que a tiempos tardíos de infección el virus seguiría disponiendo de sustrato para realizar el cap-snatching, aunque en principio no lo necesitaría ya que la síntesis de mRNA virales es prácticamente nula a partir de las 5 hpi (Hay et al., 1977; Shapiro et al., 1987) y la degradación de la RNAP II comienza a observarse a las 4-6 hpi.

Se ha descrito que distintos virus inducen modificaciones de la maquinaria de transcripción celular como una medida de contrarrestar la defensa antiviral de la célula. Por ejemplo, la proteína ML del virus Thogoto interacciona con el factor de transcripción IIB (TFIIB) y de esta forma induce una fuerte disminución de la expresión desde promotores regulados por IRF3 y NF- $\kappa$ B (Vogt et al., 2008). De forma similar, la proteína NSs del virus Bunyamwera inhibe la fosforilación de la Ser2 del CTD y de esta forma bloquea la síntesis de IFN en las células infectadas (Thomas et al., 2004). En el caso del virus de la gripe, el hecho de que la degradación e inhibición de la RNAP II coincida con el final de la síntesis de mRNA viral podría indicar que, una vez que el virus ya no necesita del aporte de sustrato para el *cap-snatching*, la degradación e inhibición del componente principal de la maquinaria de transcripción celular supone una contribución adicional al *shut-off* general en la expresión génica que se observa durante la infección. Indudablemente, para que esto suceda tiene que ocurrir alguna señalización para que el virus no transcriba y por lo tanto no necesite la actividad de la RNAP II.

Se podría pensar que el hecho de que se observe degradación de la forma hipofosforilada de la subunidad mayor de la RNAP II es contradictorio con el hecho de que esta forma de la RNAP II es la que se une a las regiones promotoras del DNA para, luego de ser fosforilada en los residuos Ser5 e iniciar la transcripción. Sin embargo, hay que recordar que la transcripción celular es un proceso cíclico en el cual la RNAP II es reciclada. Además se debe tener en cuenta que en los experimentos

realizados se está observando una “foto fija” de este proceso dinámico. Por lo tanto, es posible que realmente no sea la forma hipofosforilada la que está siendo degradada, sino por ejemplo la forma fosforilada en Ser2. Si este fuera el caso, y debido a que hay una transformación continua de la forma hipofosforilada a las formas hiperfosforiladas, en la “foto fija” se observaría que éstas últimas formas se mantendrían sin cambios mientras se tendría una disminución en las cantidades de la forma hipofosforilada. Debido a que la forma hipofosforilada es la forma posterior en el ciclo a la forma fosforilada en Ser2, su desaparición en realidad sería un reflejo de la disminución del *pool* total de RNAP II mas que una degradación de esa forma en sí misma. De acuerdo con esto, se ha descrito que a tiempos tardíos de infección, además de la degradación de la forma hipofosforilada, se observa la desaparición de las formas hiperfosforiladas (Fodor, 2008).

Si este modelo fuera correcto, se podría pensar que en realidad también existe interacción entre la polimerasa viral y la forma fosforilada en Ser2 de la RNAP II, pero como esta interacción conlleva la degradación de la RNAP II, sería demasiado lábil como para ser detectada por los métodos que se han utilizado para analizar la asociación entre la polimerasa viral y la RNAP II. Esto también estaría de acuerdo con que el virus inhiba la elongación de la transcripción celular, ya que si la fosforilación en el residuo Ser2 es el “disparador” de la degradación, la RNAP II no podría terminar de sintetizar el mRNA del gen sobre el que se encuentra en ese momento.

## 2.2.- Relación entre la degradación de la RNAP II y la patogenicidad

Teniendo en cuenta que la degradación de la forma hipofosforilada de la RNAP II puede contribuir por un lado al *shut-off* celular y por otro a la mortalidad celular, ya que una célula sin RNAP II no es viable, se podría considerar estos procesos como parte de la patogenicidad viral. Por lo tanto, se decidió analizar si existía relación entre la patogenicidad de las cepas virales y la capacidad para degradar e inhibir la RNAP II. En este sentido, además de las cepas de laboratorio estudiadas anteriormente, se analizó el comportamiento de aislados naturales de distintos orígenes, incluido un virus aviar H5N1 altamente patogénico, observándose que todos ellos inducen la degradación (**Figura 44**). También, se analizó la capacidad de la cepa vacunal PR8 para degradar e inhibir la RNAP II. En este caso se observó que esta cepa no degrada la RNAP II (**Figura 37**), independientemente del origen de las líneas celulares utilizadas (**Figura 38**). Sin embargo, PR8 produce un *band shift* desde la forma con mayor movilidad electroforética reconocida por el anticuerpo 8WG16, a la de menor movilidad. Esta banda superior es distinta de las fosforiladas en Ser2 y Ser5 (**Figura 25**) y podría representar un intermedio de fosforilación de la RNAP II, otro tipo de modificación postraduccional, o fosforilación en Ser7, residuo para el cual no se ha caracterizado la reactividad del anticuerpo 8WG16 ya que su fosforilación durante la transcripción celular ha sido descrita recientemente (Chapman et al., 2007; Egloff et al., 2007). Sin embargo, la cepa PR8 si produce inhibición de la actividad de la RNAP II, aunque esta es aproximadamente un 50% de la producida

por la cepa VIC (**Figura 40**). Esto podría significar que, además de la degradación de la RNAP II, existen otros mecanismos que están involucrados en la inhibición de la transcripción celular. Por ejemplo, al ser procesos conectados, la inhibición del *splicing* (Garaigorta and Ortin, 2007; Qiu et al., 1995), el procesamiento del extremo 3' de los pre-mRNAs (Chen et al., 1999) o la inhibición del transporte de los mRNAs celulares (Fortes et al., 1994; Katze and Krug, 1984; Qian et al., 1994; Qiu and Krug, 1994; Satterly et al., 2007) podría afectar a la transcripción celular. También sería posible que el *band shift* inducido por la cepa PR8 fuera un paso inicial en el proceso de degradación de la RNAP II, pero por alguna razón dicha cepa no tenga la capacidad de terminar el proceso. En este sentido, y teniendo en cuenta que la subunidad PA de la polimerasa viral tiene actividad proteolítica, es de destacar que, al igual que la proteína PA de la cepa VIC, la PA de PR8 es capaz de degradar proteínas co-expresadas a 37°C, aunque con menor actividad, mientras que dicha capacidad se ve drásticamente disminuida a 33°C (Naffakh et al., 2001).

También se analizó el comportamiento de la cepa A/Ann Arbor/6/60 *cold-adapted*, otra cepa vacunal. Al igual que lo observado con PR8, la cepa Ann Arbor es incapaz de degradar la subunidad mayor de la RNAP II en todos los tipos celulares utilizados (**Figura 43**), mientras que también parece inducir un *band shift* similar al observado con la cepa PR8, lo cual refuerza la idea de que esto podría ser un paso del proceso de degradación de la RNAP II, que por alguna razón las cepas atenuadas no son capaces de completar.

La relación entre patogenicidad y

degradación de la RNAP II se ve reforzada por el hecho de que una cepa PR8 altamente patogénica (hvPR8), que se obtuvo al analizar la patogenicidad en ratón de una librería de virus PR8 pasados en laboratorio (Grimm et al., 2007), induce la degradación de la forma hipofosforilada de la RNAP II, mientras que una cepa *wild type* de baja patogenicidad (lvPR8) obtenida en el mismo estudio no es capaz de producir la degradación de la RNAP II (**Figura 45**).

### 2.3.- ¿Quién es el responsable de la degradación de la subunidad mayor de la RNAP II?

Teniendo en cuenta que el proteosoma es el principal complejo de degradación de proteínas celular, se analizó su implicación en la degradación de la RNAP II inducida por la infección con el virus de la gripe. A diferencia de lo que se ha observado con el virus Herpes Simplex tipo 1, el cual induce la degradación de la forma fosforilada en Ser2 de la RNAP II por el proteosoma (Dai-Ju et al., 2006), este proceso proteolítico no es el responsable de la degradación de la RNAP II inducida por la infección por el virus de la gripe (**Figura 33**).

Habiendo descartado la participación del proteosoma y considerando que la subunidad PA de la polimerasa tiene actividad proteasa, la cual, al igual que la degradación de la RNAP II inducida por la infección no es inhibida por inhibidores del proteosoma, y que la polimerasa del virus interacciona con la RNAP II, se analizó la implicación de la polimerasa o sus componentes en la inducción de la degradación de la RNAP II. Ni las subunidades individuales ni combinaciones de dos de ellas fue capaz

de inducir la degradación de la RNAP II (**Figura 34**), de acuerdo con la incapacidad para asociarse a la RNAP II observada (Engelhardt et al., 2005). Sin embargo, al transfectar la polimerasa viral completa sí se observó degradación de la RNAP II (**Figura 35**), por lo que se puede concluir que el complejo de la polimerasa viral es suficiente para inducir la degradación de la RNAP II. La degradación de la RNAP II observada en estas condiciones es ligeramente menor que la producida durante la infección. Esto podría deberse a que la eficiencia de co-transfección de los tres plásmidos de expresión de las subunidades de la polimerasa es como máximo del 60% (datos no mostrados), por lo que aproximadamente en la mitad de las células del cultivo no se tiene degradación de la RNAP II, lo que en parte enmascara la degradación producida en las células que recibieron los tres plásmidos. Aunque tampoco se puede descartar la implicación de otra proteína viral o celular.

La implicación del complejo de la polimerasa viral en la degradación de la RNAP II, y en especial de la subunidad PA, se ve reforzada por la observación de que un virus rescatado con una PA que lleva una mutación puntual que hace que la actividad proteolítica de la misma sea considerablemente inferior que la proteína *wild type* (Huarte et al., 2003; Perales et al., 2000), tiene un retraso en la degradación de la forma hipofosforilada de la RNAP II (**Figura 36**). Además, es de destacar que al analizar genéticamente los determinantes de la patogenicidad de la cepa PR8 altamente patogénica (hvPR8) mediante virus recombinantes, se encontró que las proteínas implicadas eran HA, NA y la polimerasa viral. HA y NA median la

entrada viral en las células hospedadoras y la liberación de las partículas progenie. Sin embargo, en experimentos de alta multiplicidad en células en cultivo, el aporte de estas proteínas a la patogenicidad se ve reducido. Por un lado se fuerzan las condiciones de unión y entrada del virus en la célula hospedadora y por el otro la eficiencia de liberación de nuevas partículas y reinfección no se ve reflejada en este tipo de experimentos porque la totalidad del cultivo está infectado. Además, en general, los tiempos en que se realizan estos experimentos no permitirían observar efectos de reinfección. Por lo tanto, en células en cultivo, la polimerasa viral sería la principal responsable de la patogenicidad asociada a la cepa PR8 altamente patogénica.

Teniendo en cuenta la implicación del complejo de la polimerasa viral en la degradación de la RNAP II, el hecho de que PA tenga actividad proteasa y el resultado obtenido con el virus recombinante con una PA defectiva en proteólisis, se decidió analizar genéticamente la implicación de esta subunidad en la inducción de la degradación. Para ello se rescataron virus recombinantes en los que se intercambia el segmento de PA entre virus que inducen la degradación y la cepa PR8. Los fenotipos de degradación obtenidos son intermedios con respecto a los virus rescatados *wild type* (**Figura 46**), lo que indican que la subunidad PA está implicada en la degradación de la RNAP II, y que posiblemente algún otro componente de la polimerasa está también implicado.

En el laboratorio se han utilizado virus recombinantes con intercambio de segmentos de la polimerasa entre las cepas hvPR8 y lvPR8, aunque no se

han incluido en esta memoria ya que los mismos fueron generados en el laboratorio de G. Kochs, quien al momento de escribir esta tesis todavía no había publicado la caracterización de los mismos. En los estudios realizados con estos virus en los que se intercambió el segmento de PA entre hvPR8 y lvPR8, se obtienen resultados similares a los observados con nuestros virus recombinantes, lo que confirma la implicación de PA en la degradación de la RNAP II. Al intercambiar el segmento PB1 no se observan diferencias de comportamiento con respecto a los virus parentales, esto es, el virus que contiene todos los segmentos de lvPR8 excepto PB1 no degrada la RNAP II, mientras que el virus con todos los segmentos de hvPR8 excepto PB1 sí la degrada. Finalmente, al intercambiar el segmento de PB2 los virus se comportan como en el caso del intercambio de PA, esto es, se obtiene fenotipos intermedios. Por lo tanto, podemos concluir que además de PA, la subunidad PB2 también está implicada en la degradación de la RNAP II.

La maquinaria de síntesis de RNA viral tiene un papel importante no sólo en la producción de la progenie viral, sino que también está implicada en la patogenicidad viral. Por ejemplo, se ha descrito que la polimerasa viral es un determinante del rango de hospedador (Chen et al., 2006; Gabriel et al., 2007; Gabriel et al., 2008; Subbarao et al., 1993), un factor de patogenicidad (Hatta et al., 2001; Hulse-Post et al., 2007; Munster et al., 2007; Pappas et al., 2008; Salomon et al., 2006; Tumpey et al., 2005; Watanabe et al., 2009) y un factor crucial en el proceso de adaptación de virus aviares a mamíferos (Gabriel et al., 2005; Shinya et al., 2007).

En este sentido, el virus recombinante que expresa una proteína PA menos proteolítica, además de su retraso en la degradación de la RNAP II muestra un fenotipo atenuado en ratones (Huarte et al., 2003). A su vez, en parte la alta patogenicidad del virus hvPR8 se debe a la mayor actividad de la polimerasa de este virus con respecto a la del lvPR8 (Grimm et al., 2007). Es mas, recientemente se ha determinado que mutaciones puntuales en PA y PB2 que aumentan la actividad de la polimerasa viral del virus hvPR8, contribuyen a la alta virulencia de este virus en ratones. De acuerdo con esto, se ha descrito que los genes codificantes de las tres subunidades de la polimerasa viral son los responsables de la atenuación de la cepa PR8 (Florent, 1980). Finalmente, múltiples trabajos han determinado que los componentes de la polimerasa son responsables de la atenuación de la cepa Ann Arbor (Jin et al., 2004; Snyder et al., 1988; Herlocher et al., 1996; Snyder et al., 1985).

Todo esto indica que la capacidad de degradar la RNAP II e inhibir la maquinaria de transcripción celular sería una característica de los virus de la gripe que contribuye a su virulencia.

### 3.- CONSIDERACIONES FINALES

En esta tesis se ha profundizado en el papel que tiene la proteína celular hCLE en el ciclo viral, en los efectos que la infección tiene sobre la maquinaria de transcripción celular y en la relación entre la patogenicidad viral y la inducción de estos cambios. Todos estos eventos implican interacciones entre proteínas celulares y

virales, lo que resalta la importancia que la determinación de dichas interacciones puede tener, aportando a un mejor entendimiento de la biología viral, que finalmente puede conducir a un mejor entendimiento de la adaptación del virus de la gripe a diferentes hospedadores. En especial, es importante entender la interacción entre el complejo de la polimerasa viral y los factores celulares ya que nuevos conocimientos sobre como la célula hospedadora influencia la síntesis viral o como la expresión génica viral altera las funciones celulares, pueden conducir al desarrollo de nuevas estrategias para inhibir la multiplicación viral.











- 1.- El silenciamiento de hCLE produce una importante disminución en la actividad de las RNPs virales. La producción de partículas virales disminuye ligeramente en estas condiciones, mientras que la síntesis y acumulación de proteínas virales no se ve afectada.
- 2.- La proteína celular hCLE se sobre-expresa durante la infección con el virus de la gripe y se encuentra presente en los viriones del virus de la gripe.
- 3.- La infección por el virus de la gripe produce la degradación de la forma hipofosforilada de la subunidad mayor de la RNA polimerasa II celular. Esta degradación conlleva la inhibición de la transcripción celular.
- 4.- La expresión del complejo de la polimerasa viral es suficiente para inducir la degradación de la RNA polimerasa II.
- 5.- Todas las cepas de laboratorio y aislados naturales analizados, excepto las cepas atenuadas A/PR/8/34 y A/Ann Arbor/6/60 *cold-adapted*, producen la degradación de la RNA polimerasa II.
- 6.- La subunidad PA de la polimerasa viral está involucrada en la inducción de la degradación de la forma hipofosforilada de la RNA polimerasa II.







- Adelman, K., Marr, M. T., Werner, J., *et al.* (2005). Efficient release from promoter-proximal stall sites requires transcript cleavage factor TFIIS. *Mol Cell* **17**(1), 103-112.
- Akkina, R. K., Chambers, T. M., Londo, D. R., *et al.* (1987). Intracellular localization of the viral polymerase proteins in cells infected with influenza virus and cells expressing PB1 protein from cloned cDNA. *J Virol* **61**(7), 2217-2224.
- Albo, C., Valencia, A., and Portela, A. (1995). Identification of an RNA binding region within the N-terminal third of the influenza A virus nucleoprotein. *J Virol* **69**(6), 3799-3806.
- Ammosova, T., Jerebtsova, M., Beullens, M., *et al.* (2005). Nuclear targeting of protein phosphatase-1 by HIV-1 Tat protein. *J Biol Chem* **280**(43), 36364-36371.
- Amorim, M. J., Read, E. K., Dalton, R. M., *et al.* (2007). Nuclear export of influenza A virus mRNAs requires ongoing RNA polymerase II activity. *Traffic* **8**(1), 1-11.
- Aragón, T., de la Luna, S., Novoa, I., *et al.* (2000). Eukaryotic translation initiation factor 4G1 is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus. *Mol Cell Biol* **20**(17), 6259-6268.
- Area, E., Martin-Benito, J., Gastaminza, P., *et al.* (2004). 3D structure of the influenza virus polymerase complex: localization of subunit domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(1), 308-313.
- Arrese, M., and Portela, A. (1996). Serine 3 is critical for phosphorylation at the N-terminal end of the nucleoprotein of influenza virus A/Victoria/3/75. *J Virol* **70**(6), 3385-3391.
- Arzt, S., Baudin, F., Barge, A., *et al.* (2001). Combined results from solution studies on intact influenza virus M1 protein and from a new crystal form of its N-terminal domain show that M1 is an elongated monomer. *Virology* **279**(2), 439-446.
- Asano, Y., and Ishihama, A. (1997). Identification of two nucleotide-binding domains on the PB1 subunit of influenza virus RNA polymerase. *J Biochem* **122**(3), 627-634.
- Asano, Y., Mizumoto, K., Maruyama, T., *et al.* (1995). Photoaffinity labeling of influenza virus RNA polymerase PB1 subunit with 8-azido GTP. *J Biochem* **117**(3), 677-682.
- Avalos, R. T., Yu, Z., and Nayak, D. P. (1997). Association of influenza virus NP and M1 proteins with cellular cytoskeletal elements in influenza virus-infected cells. *J Virol* **71**(4), 2947-2958.
- Bae, S. H., Cheong, H. K., Lee, J. H., *et al.* (2001). Structural features of an influenza virus promoter and their implications for viral RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(19), 10602-10607.
- Baek, M. C., Krosky, P. M., Pearson, A., *et al.* (2004). Phosphorylation of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain in human cytomegalovirus-infected cells and in vitro by the viral UL97 protein kinase. *Virology* **324**(1), 184-193.
- Baltimore, D. (1971). Expression of animal virus genomes. *Bacteriol. Rev.* **35**, 235-241.
- Barcena, J., Ochoa, M., de la Luna, S., *et al.* (1994). Monoclonal antibodies against influenza virus PB2 and NP polypeptides interfere with the initiation step of viral mRNA synthesis in vitro. *J Virol* **68**(11), 6900-6909.

- Bark-Jones, S. J., Webb, H. M., and West, M. J. (2006). EBV EBNA 2 stimulates CDK9-dependent transcription and RNA polymerase II phosphorylation on serine 5. *Oncogene* **25**(12), 1775-1785.
- Barrett, T., Wolstenholme, A. J., and Mahy, B. W. (1979). Transcription and replication of influenza virus RNA. *Virology* **98**(1), 211-225.
- Bates, G. J., Nicol, S. M., Wilson, B. J., *et al.* (2005). The DEAD box protein p68: a novel transcriptional coactivator of the p53 tumour suppressor. *Embo J* **24**(3), 543-553.
- Baudin, F., Bach, C., Cusack, S., *et al.* (1994). Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. *Embo J* **13**(13), 3158-3165.
- Beare, A. S., Schild, G. C., and Craig, J. W. (1975). Trials in man with live recombinants made from A/PR/8/34 (H0 N1) and wild H3 N2 influenza viruses. *Lancet* **2**(7938), 729-732.
- Beaton, A. R., and Krug, R. M. (1986). Transcription antitermination during influenza viral template RNA synthesis requires the nucleocapsid protein and the absence of a 5' capped end. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(17), 6282-6286.
- Biswas, S. K., Boutz, P. L., and Nayak, D. P. (1998). Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins. *J Virol* **72**(7), 5493-5501.
- Biswas, S. K., and Nayak, D. P. (1994). Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1. *J Virol* **68**(3), 1819-1826.
- Biswas, S. K., and Nayak, D. P. (1996). Influenza virus polymerase basic protein 1 interacts with influenza virus polymerase basic protein 2 at multiple sites. *J Virol* **70**(10), 6716-6722.
- Blaas, D., Patzelt, E., and Kuechler, E. (1982a). Cap-recognizing protein of influenza virus. *Virology* **116**(1), 339-348.
- Blaas, D., Patzelt, E., and Kuechler, E. (1982b). Identification of the cap binding protein of influenza virus. *Nucleic Acids Res* **10**(15), 4803-4812.
- Blok, J., and Air, G. M. (1982). Variation in the membrane-insertion and "stalk" sequences in eight subtypes of influenza type A virus neuraminidase. *Biochemistry* **21**(17), 4001-4007.
- Bouloy, M., Plotch, S. J., and Krug, R. M. (1978). Globin mRNAs are primers for the transcription of influenza viral RNA in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(10), 4886-4890.
- Bourmakina, S. V., and Garcia-Sastre, A. (2005). The morphology and composition of influenza A virus particles are not affected by low levels of M1 and M2 proteins in infected cells. *J Virol* **79**(12), 7926-7932.
- Braam, J., Ulmanen, I., and Krug, R. M. (1983). Molecular model of a eucaryotic transcription complex: functions and movements of influenza P proteins during capped RNA-primed transcription. *Cell* **34**(2), 609-618.
- Brendel, C., Rehbein, M., Kreienkamp, H. J., *et al.* (2004). Characterization of Staufien 1 ribonucleoprotein complexes. *Biochem J* **384**(Pt 2), 239-246.
- Brewster, N. K., Johnston, G. C., and Singer, R. A. (1998). Characterization of the CP complex, an abundant dimer of Cdc68 and Pab3 proteins that regulates yeast transcriptional activation and



- chromatin repression. *J Biol Chem* **273**(34), 21972-21979.
- Briedis, D. J., Conti, G., Munn, E. A., *et al.* (1981). Migration of influenza virus-specific polypeptides from cytoplasm to nucleus of infected cells. *Virology* **111**(1), 154-164.
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R., and Agami, R. (2002a). Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell* **2**(3), 243-247.
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R., and Agami, R. (2002b). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**(5567), 550-553.
- Bucher, E., Hemmes, H., de Haan, P., *et al.* (2004). The influenza A virus NS1 protein binds small interfering RNAs and suppresses RNA silencing in plants. *J Gen Virol* **85**(Pt 4), 983-991.
- Bui, M., Wills, E. G., Helenius, A., *et al.* (2000). Role of the influenza virus M1 protein in nuclear export of viral ribonucleoproteins. *J Virol* **74**(4), 1781-1786.
- Bukrinskaya, A. G., Vorkunova, G. K., and Vorkunova, N. K. (1979). Cytoplasmic and nuclear input virus RNPs in influenza virus-infected cells. *J Gen Virol* **45**(3), 557-567.
- Bullido, R., Gomez-Puertas, P., Saiz, M. J., *et al.* (2001). Influenza A virus NEP (NS2 protein) downregulates RNA synthesis of model template RNAs. *J Virol* **75**(10), 4912-4917.
- Bullough, P. A., Hughson, F. M., Skehel, J. J., *et al.* (1994). Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature* **371**(6492), 37-43.
- Buratowski, S. (2003). The CTD code. *Nat Struct Biol* **10**(9), 679-680.
- Burgui Herrera, I. (2006). Traducción selectiva de mRNAs del virus de la gripe: independencia de la proteína de unión al cap eIF4E y caracterización de proteínas virales implicadas. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Burgui, I., Aragon, T., Ortin, J., *et al.* (2003). PABP1 and eIF4GI associate with influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes. *J Gen Virol* **84**(Pt 12), 3263-3274.
- Burgui, I., Yanguéz, E., Sonenberg, N., *et al.* (2007). Influenza virus mRNA translation revisited: is the eIF4E cap-binding factor required for viral mRNA translation? *J Virol* **81**(22), 12427-12438.
- Butt, K. M., Smith, G. J., Chen, H., *et al.* (2005). Human infection with an avian H9N2 influenza A virus in Hong Kong in 2003. *J Clin Microbiol* **43**(11), 5760-5767.
- Carr, S. M., Carnero, E., Garcia-Sastre, A., *et al.* (2006). Characterization of a mitochondrial-targeting signal in the PB2 protein of influenza viruses. *Virology* **344**(2), 492-508.
- Caton, A. J., and Robertson, J. S. (1980). Structure of the host-derived sequences present at the 5' ends of influenza virus mRNA. *Nucleic Acids Res* **8**(12), 2591-2603.
- Claas, E. C., Osterhaus, A. D., van Beek, R., *et al.* (1998). Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet* **351**(9101), 472-477.
- Clark, M. E., Lieberman, P. M., Berk, A. J., *et al.* (1993). Direct cleavage of human TATA-binding protein by poliovirus protease 3C in vivo and in vitro. *Mol Cell*

- Biol* **13**(2), 1232-1237.
- Clemens, M. J., Bushell, M., and Morley, S. J. (1998). Degradation of eukaryotic polypeptide chain initiation factor (eIF) 4G in response to induction of apoptosis in human lymphoma cell lines. *Oncogene* **17**(22), 2921-2931.
- Colgan, D. F., and Manley, J. L. (1997). Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes Dev* **11**(21), 2755-2766.
- Colman, P. M., Varghese, J. N., and Laver, W. G. (1983). Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature* **303**(5912), 41-44.
- Compans, R. W., and Chopin, P.W. (1975). "Reproduction of Myxoviruses." Comprehensive Virology. (Fraenkel-Conrat, H., and Wagner, R.R., Ed.), Vol 4 Plenum Press, New York.
- Compans, R. W., Content, J., and Duesberg, P. H. (1972). Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus. *J Virol* **10**(4), 795-800.
- Conenello, G. M., Zamarin, D., Perrone, L. A., *et al.* (2007). A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence. *PLoS Pathog* **3**(10), 1414-1421.
- Cong, Y. L., Wang, C. F., Yan, C. M., *et al.* (2008). Swine infection with H9N2 influenza viruses in China in 2004. *Virus Genes* **36**(3), 461-469.
- Coppola, J. A., Field, A. S., and Luse, D. S. (1983). Promoter-proximal pausing by RNA polymerase II in vitro: transcripts shorter than 20 nucleotides are not capped. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(5), 1251-1255.
- Couceiro, J. N., Paulson, J. C., and Baum, L. G. (1993). Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. *Virus Res* **29**(2), 155-165.
- Cujec, T. P., Cho, H., Maldonado, E., *et al.* (1997a). The human immunodeficiency virus transactivator Tat interacts with the RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell Biol* **17**(4), 1817-1823.
- Cujec, T. P., Okamoto, H., Fujinaga, K., *et al.* (1997b). The HIV transactivator TAT binds to the CDK-activating kinase and activates the phosphorylation of the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Genes Dev* **11**(20), 2645-2657.
- Chabot, B., Bisotto, S., and Vincent, M. (1995). The nuclear matrix phosphoprotein p255 associates with splicing complexes as part of the [U4/U6.U5] tri-snRNP particle. *Nucleic Acids Res* **23**(16), 3206-3213.
- Chan, A. Y., Vreede, F. T., Smith, M., *et al.* (2006). Influenza virus inhibits RNA polymerase II elongation. *Virology* **351**(1), 210-217.
- Chapman, R. D., Heidemann, M., Albert, T. K., *et al.* (2007). Transcribing RNA polymerase II is phosphorylated at CTD residue serine-7. *Science* **318**(5857), 1780-1782.
- Chatel-Chaix, L., Clement, J. F., Martel, C., *et al.* (2004). Identification of Staufien in the human immunodeficiency virus type 1 Gag ribonucleoprotein complex and a role in generating infectious viral particles. *Mol Cell Biol* **24**(7), 2637-2648.
- Chen, G. W., Chang, S. C., Mok, C. K.,

- et al.* (2006). Genomic signatures of human versus avian influenza A viruses. *Emerg Infect Dis* **12**(9), 1353-1360.
- Chen, H., Matsuoka, Y., Chen, Q., *et al.* (2003a). Generation and characterization of an H9N2 cold-adapted reassortant as a vaccine candidate. *Avian Dis* **47**(3 Suppl), 1127-1130.
- Chen, H., Matsuoka, Y., Swayne, D., *et al.* (2003b). Generation and characterization of a cold-adapted influenza A H9N2 reassortant as a live pandemic influenza virus vaccine candidate. *Vaccine* **21**(27-30), 4430-4436.
- Chen, W., Calvo, P. A., Malide, D., *et al.* (2001). A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med* **7**(12), 1306-1312.
- Chen, Z., Li, Y., and Krug, R. M. (1999). Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *Embo J* **18**(8), 2273-2283.
- Chen, Z., Santos, C., Aspelund, A., *et al.* (2009). Evaluation of live attenuated influenza a virus h6 vaccines in mice and ferrets. *J Virol* **83**(1), 65-72.
- Cheng, A., Wong, S. M., and Yuan, Y. A. (2009). Structural basis for dsRNA recognition by NS1 protein of influenza A virus. *Cell Res* **19**(2), 187-195.
- Cheong, H. K., Cheong, C., Lee, Y. S., *et al.* (1999). Structure of influenza virus panhandle RNA studied by NMR spectroscopy and molecular modeling. *Nucleic Acids Res* **27**(5), 1392-1397.
- Cheung, C. Y., Poon, L. L., Lau, A. S., *et al.* (2002). Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease? *Lancet* **360**(9348), 1831-1837.
- Cho, H., Kim, T. K., Mancebo, H., *et al.* (1999). A protein phosphatase functions to recycle RNA polymerase II. *Genes Dev* **13**(12), 1540-1552.
- Chung, W. H., Craighead, J. L., Chang, W. H., *et al.* (2003). RNA polymerase II/TFIIF structure and conserved organization of the initiation complex. *Mol Cell* **12**(4), 1003-1013.
- Dai-Ju, J. Q., Li, L., Johnson, L. A., *et al.* (2006). ICP27 interacts with the C-terminal domain of RNA polymerase II and facilitates its recruitment to herpes simplex virus 1 transcription sites, where it undergoes proteasomal degradation during infection. *J Virol* **80**(7), 3567-3581.
- Dantoni, J. C., Murthy, K. G., Manley, J. L., *et al.* (1997). Transcription factor TFIID recruits factor CPSF for formation of 3' end of mRNA. *Nature* **389**(6649), 399-402.
- de la Luna, S., Fortes, P., Beloso, A., *et al.* (1995). Influenza virus NS1 protein enhances the rate of translation initiation of viral mRNAs. *J Virol* **69**(4), 2427-2433.
- de la Luna, S., Martin, J., Portela, A., *et al.* (1993). Influenza virus naked RNA can be expressed upon transfection into cells co-expressing the three subunits of the polymerase and the nucleoprotein from simian virus 40 recombinant viruses. *J Gen Virol* **74** ( Pt 3), 535-539.
- de la Luna, S., Martinez, C., and Ortin, J. (1989). Molecular cloning and sequencing of influenza virus A/Victoria/3/75 polymerase genes: sequence evolution and prediction of

- possible functional domains. *Virus Res* **13**(2), 143-155.
- de la Torre, J. C. (2002). Molecular biology of Borna disease virus and persistence. *Front Biosci* **7**, d569-579.
- Deng, L., Ammosova, T., Pumfery, A., *et al.* (2002). HIV-1 Tat interaction with RNA polymerase II C-terminal domain (CTD) and a dynamic association with CDK2 induce CTD phosphorylation and transcription from HIV-1 promoter. *J Biol Chem* **277**(37), 33922-33929.
- Deng, T., Engelhardt, O. G., Thomas, B., *et al.* (2006). Role of ran binding protein 5 in nuclear import and assembly of the influenza virus RNA polymerase complex. *J Virol* **80**(24), 11911-11919.
- Deng, T., Sharps, J., Fodor, E., *et al.* (2005). In vitro assembly of PB2 with a PB1-PA dimer supports a new model of assembly of influenza A virus polymerase subunits into a functional trimeric complex. *J Virol* **79**(13), 8669-8674.
- Desselberger, U., Racaniello, V. R., Zazra, J. J., *et al.* (1980). The 3' and 5'-terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementarity. *Gene* **8**(3), 315-328.
- Detjen, B. M., St Angelo, C., Katze, M. G., *et al.* (1987). The three influenza virus polymerase (P) proteins not associated with viral nucleocapsids in the infected cell are in the form of a complex. *J Virol* **61**(1), 16-22.
- Dhar, R., Chanock, R. M., and Lai, C. J. (1980). Nonviral oligonucleotides at the 5' terminus of cytoplasmic influenza viral mRNA deduced from cloned complete genomic sequences. *Cell* **21**(2), 495-500.
- Dias, A., Bouvier, D., Crepin, T., *et al.* (2009). The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature* **458**(7240), 914-918.
- Digard, P., Blok, V. C., and Inglis, S. C. (1989). Complex formation between influenza virus polymerase proteins expressed in *Xenopus* oocytes. *Virology* **171**(1), 162-169.
- Digard, P., Elton, D., Bishop, K., *et al.* (1999). Modulation of nuclear localization of the influenza virus nucleoprotein through interaction with actin filaments. *J Virol* **73**(3), 2222-2231.
- Doan, L., Handa, B., Roberts, N. A., *et al.* (1999). Metal ion catalysis of RNA cleavage by the influenza virus endonuclease. *Biochemistry* **38**(17), 5612-5619.
- DuBridge, R. B., Tang, P., Hsia, H. C., *et al.* (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* **7**(1), 379-387.
- Duesberg, P. H. (1969). Distinct subunits of the ribonucleoprotein of influenza virus. *J Mol Biol* **42**(3), 485-499.
- Duhaut, S. D., and McCauley, J. W. (1996). Defective RNAs inhibit the assembly of influenza virus genome segments in a segment-specific manner. *Virology* **216**(2), 326-337.
- Durand, L. O., Advani, S. J., Poon, A. P., *et al.* (2005). The carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II is phosphorylated by a complex containing cdk9 and infected-cell protein 22 of herpes simplex virus 1. *J Virol* **79**(11), 6757-6762.
- Duroux, M., Houben, A., Ruzicka, K., *et al.* (2004). The chromatin remodelling

- complex FACT associates with actively transcribed regions of the Arabidopsis genome. *Plant J* **40**(5), 660-671.
- Egloff, S., O'Reilly, D., Chapman, R. D., *et al.* (2007). Serine-7 of the RNA polymerase II CTD is specifically required for snRNA gene expression. *Science* **318**(5857), 1777-1779.
- Els, M. C., Air, G. M., Murti, K. G., *et al.* (1985). An 18-amino acid deletion in an influenza neuraminidase. *Virology* **142**(2), 241-247.
- Elton, D., Digard, P., Tiley, L., Ortín, J. (2005). "Structure and function of the influenza virus RNP." Contemporary topics in influenza virology (Y, K., Ed.) Horizon Scientific Press, Norfolk.
- Elton, D., Medcalf, L., Bishop, K., *et al.* (1999). Identification of amino acid residues of influenza virus nucleoprotein essential for RNA binding. *J Virol* **73**(9), 7357-7367.
- Elton, D., Simpson-Holley, M., Archer, K., *et al.* (2001). Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. *J Virol* **75**(1), 408-419.
- Elvira, G., Wasiak, S., Blandford, V., *et al.* (2006). Characterization of an RNA granule from developing brain. *Mol Cell Proteomics* **5**(4), 635-651.
- Elliott, R. M. (1999). Encyclopedia of Virology (Granoff, A., and Webster, R.G., Ed.), pp. 212-216. Academic Press, London.
- Enami, K., Sato, T. A., Nakada, S., *et al.* (1994). Influenza virus NS1 protein stimulates translation of the M1 protein. *J Virol* **68**(3), 1432-1437.
- Enami, M., and Enami, K. (1996). Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase glycoproteins stimulate the membrane association of the matrix protein. *J Virol* **70**(10), 6653-6657.
- Engelhardt, O. G., Sirma, H., Pandolfi, P. P., *et al.* (2004). Mx1 GTPase accumulates in distinct nuclear domains and inhibits influenza A virus in cells that lack promyelocytic leukaemia protein nuclear bodies. *J Gen Virol* **85**(Pt 8), 2315-2326.
- Engelhardt, O. G., Smith, M., and Fodor, E. (2005). Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II. *J Virol* **79**(9), 5812-5818.
- Evans, D. R., Brewster, N. K., Xu, Q., *et al.* (1998). The yeast protein complex containing cdc68 and pob3 mediates core-promoter repression through the cdc68 N-terminal domain. *Genetics* **150**(4), 1393-1405.
- Falcón, A. M., Fortes, P., Marion, R. M., *et al.* (1999). Interaction of influenza virus NS1 protein and the human homologue of Staufer in vivo and in vitro. *Nucleic Acids Res* **27**(11), 2241-2247.
- Falcón, A. M., Marion, R. M., Zurcher, T., *et al.* (2004). Defective RNA replication and late gene expression in temperature-sensitive influenza viruses expressing deleted forms of the NS1 protein. *J Virol* **78**(8), 3880-3888.
- Fazekas De St Groth, S. (1948). Viropexis, the mechanism of influenza virus infection. *Nature* **162**(4112), 294.
- Fechter, P., Mingay, L., Sharps, J., *et al.* (2003). Two aromatic residues in the PB2 subunit of influenza A RNA polymerase are crucial for cap binding. *J Biol Chem* **278**(22), 20381-20388.
- Flick, R., and Hobom, G. (1999). Interaction of influenza virus polymerase with viral RNA in the 'corkscrew'

- conformation. *J Gen Virol* **80** ( Pt 10), 2565-2572.
- Flick, R., Neumann, G., Hoffmann, E., *et al.* (1996). Promoter elements in the influenza vRNA terminal structure. *Rna* **2**(10), 1046-1057.
- Florent, G. (1980). Gene constellation of live influenza A vaccines. *Arch Virol* **64**(2), 171-173.
- Fodor, E. (2008). The influenza virus RNA polymerase: interactions with the host cell. In "XIV International Congress of Virology". International Union of Microbiological Societies, Istanbul.
- Fodor, E., Crow, M., Mingay, L. J., *et al.* (2002). A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase inhibits endonucleolytic cleavage of capped RNAs. *J Virol* **76**(18), 8989-9001.
- Fodor, E., Mingay, L. J., Crow, M., *et al.* (2003). A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase promotes the generation of defective interfering RNAs. *J Virol* **77**(8), 5017-5020.
- Fodor, E., Pritlove, D. C., and Brownlee, G. G. (1994). The influenza virus panhandle is involved in the initiation of transcription. *J Virol* **68**(6), 4092-4096.
- Fodor, E., Pritlove, D. C., and Brownlee, G. G. (1995). Characterization of the RNA-fork model of virion RNA in the initiation of transcription in influenza A virus. *J Virol* **69**(7), 4012-4019.
- Fodor, E., Seong, B. L., and Brownlee, G. G. (1993). Photochemical cross-linking of influenza A polymerase to its virion RNA promoter defines a polymerase binding site at residues 9 to 12 of the promoter. *J Gen Virol* **74** ( Pt 7), 1327-1333.
- Fortes, P., Beloso, A., and Ortin, J. (1994). Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks mRNA nucleocytoplasmic transport. *Embo J* **13**(3), 704-712.
- Fouchier, R. A., Schneeberger, P. M., Rozendaal, F. W., *et al.* (2004). Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(5), 1356-1361.
- Fraser, K. A., and Rice, S. A. (2005). Herpes simplex virus type 1 infection leads to loss of serine-2 phosphorylation on the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *J Virol* **79**(17), 11323-11334.
- Fraser, K. A., and Rice, S. A. (2007). Herpes simplex virus immediate-early protein ICP22 triggers loss of serine 2-phosphorylated RNA polymerase II. *J Virol* **81**(10), 5091-5101.
- Fuerst, T. R., Earl, P. L., and Moss, B. (1987). Use of a hybrid vaccinia virus-T7 RNA polymerase system for expression of target genes. *Mol Cell Biol* **7**(7), 2538-2544.
- Fujii, K., Fujii, Y., Noda, T., *et al.* (2005). Importance of both the coding and the segment-specific noncoding regions of the influenza A virus NS segment for its efficient incorporation into virions. *J Virol* **79**(6), 3766-3774.
- Fujii, Y., Goto, H., Watanabe, T., *et al.* (2003). Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(4), 2002-2007.
- Fujinaga, K., Irwin, D., Huang, Y., *et al.* (2004). Dynamics of human immunodeficiency virus transcription:



- P-TEFb phosphorylates RD and dissociates negative effectors from the transactivation response element. *Mol Cell Biol* **24**(2), 787-795.
- Gabriel, G., Abram, M., Keiner, B., *et al.* (2007). Differential polymerase activity in avian and mammalian cells determines host range of influenza virus. *J Virol* **81**(17), 9601-9604.
- Gabriel, G., Dauber, B., Wolff, T., *et al.* (2005). The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(51), 18590-18595.
- Gabriel, G., Herwig, A., and Klenk, H. D. (2008). Interaction of polymerase subunit PB2 and NP with importin alpha1 is a determinant of host range of influenza A virus. *PLoS Pathog* **4**(2), e11.
- Ganem, C., Devaux, F., Torchet, C., *et al.* (2003). Ssu72 is a phosphatase essential for transcription termination of snoRNAs and specific mRNAs in yeast. *Embo J* **22**(7), 1588-1598.
- Garaigorta, U., Falcon, A. M., and Ortin, J. (2005). Genetic analysis of influenza virus NS1 gene: a temperature-sensitive mutant shows defective formation of virus particles. *J Virol* **79**(24), 15246-15257.
- Garaigorta, U., and Ortin, J. (2007). Mutation analysis of a recombinant NS replicon shows that influenza virus NS1 protein blocks the splicing and nucleocytoplasmic transport of its own viral mRNA. *Nucleic Acids Res* **35**(14), 4573-4582.
- Garcia-Robles, I., Akarsu, H., Muller, C. W., *et al.* (2005). Interaction of influenza virus proteins with nucleosomes. *Virology* **332**(1), 329-336.
- Garcia-Sastre, A. (2004). Identification and characterization of viral antagonists of type I interferon in negative-strand RNA viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **283**, 249-280.
- Garcia-Sastre, A., Egorov, A., Matassov, D., *et al.* (1998). Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology* **252**(2), 324-330.
- Garfinkel, M. S., and Katze, M. G. (1992). Translational control by influenza virus. Selective and cap-dependent translation of viral mRNAs in infected cells. *J Biol Chem* **267**(13), 9383-9390.
- Garfinkel, M. S., and Katze, M. G. (1993). Translational control by influenza virus. Selective translation is mediated by sequences within the viral mRNA 5'-untranslated region. *J Biol Chem* **268**(30), 22223-22226.
- Garten, R. J., Davis, C. T., Russell, C. A., *et al.* (2009). Antigenic and Genetic Characteristics of Swine-Origin 2009 A(H1N1) Influenza Viruses Circulating in Humans. *Science*, Published Online May 22, 2009; 2010.1126/science.1176225.
- Garten, W., and Klenk, H. D. (1999). Understanding influenza virus pathogenicity. *Trends Microbiol* **7**(3), 99-100.
- Gastaminza, P., Perales, B., Falcon, A. M., *et al.* (2003). Mutations in the N-terminal region of influenza virus PB2 protein affect virus RNA replication but not transcription. *J Virol* **77**(9), 5098-5108.
- Gavin, A. C., Bosche, M., Krause, R., *et al.* (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**(6868), 141-147.

- Ge, Q., McManus, M. T., Nguyen, T., *et al.* (2003). RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(5), 2718-2723.
- Ghanem, A., Mayer, D., Chase, G., *et al.* (2007). Peptide-mediated interference with influenza A virus polymerase. *J Virol* **81**(14), 7801-7804.
- Gibbs, R. A., Rogers, J., Katze, M. G., *et al.* (2007). Evolutionary and biomedical insights from the rhesus macaque genome. *Science* **316**(5822), 222-234.
- Gibbs, R. A., Weinstock, G. M., Metzker, M. L., *et al.* (2004). Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* **428**(6982), 493-521.
- Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**(1), 175-182.
- Gómez-Puertas, P., Albo, C., Perez-Pastrana, E., *et al.* (2000). Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. *J Virol* **74**(24), 11538-11547.
- Gómez-Puertas, P., Mena, I., Castillo, M., *et al.* (1999). Efficient formation of influenza virus-like particles: dependence on the expression levels of viral proteins. *J Gen Virol* **80** ( Pt 7), 1635-1645.
- González, S., and Ortin, J. (1999a). Characterization of influenza virus PB1 protein binding to viral RNA: two separate regions of the protein contribute to the interaction domain. *J Virol* **73**(1), 631-637.
- González, S., and Ortin, J. (1999b). Distinct regions of influenza virus PB1 polymerase subunit recognize vRNA and cRNA templates. *Embo J* **18**(13), 3767-3775.
- González, S., Zurcher, T., and Ortin, J. (1996). Identification of two separate domains in the influenza virus PB1 protein involved in the interaction with the PB2 and PA subunits: a model for the viral RNA polymerase structure. *Nucleic Acids Res* **24**(22), 4456-4463.
- Goodrich, J. A., and Tjian, R. (1994). Transcription factors IIE and IIH and ATP hydrolysis direct promoter clearance by RNA polymerase II. *Cell* **77**(1), 145-156.
- Gou, Y., Xie, J., and Wang, M. (2000). [A strain of influenza A H9N2 virus repeatedly isolated from human population in China]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* **14**(3), 209-212.
- Govorkova, E. A., Rehg, J. E., Krauss, S., *et al.* (2005). Lethality to ferrets of H5N1 influenza viruses isolated from humans and poultry in 2004. *J Virol* **79**(4), 2191-2198.
- Graham, F. L., and van der Eb, A. J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**(2), 456-467.
- Greco-Stewart, V. S., Miron, P., Abraham, A., *et al.* (2007). The human RNA polymerase II interacts with the terminal stem-loop regions of the hepatitis delta virus RNA genome. *Virology* **357**(1), 68-78.
- Green, M. R. (2005). Eukaryotic transcription activation: right on target. *Mol Cell* **18**(4), 399-402.
- Grimm, D., Staeheli, P., Hufbauer, M., *et al.* (2007). Replication fitness



- determines high virulence of influenza A virus in mice carrying functional Mx1 resistance gene. *In* "Proc Natl Acad Sci U S A", Vol. 104, pp. 6806-6811.
- Guan, Y., Poon, L. L., Cheung, C. Y., *et al.* (2004). H5N1 influenza: a protean pandemic threat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(21), 8156-8161.
- Gubareva, L. V., Varich, N. L., Markushin, S. G., *et al.* (1991). Studies on the regulation of influenza virus RNA replication: a differential inhibition of the synthesis of vRNA segments in shift-up experiments with ts mutants. *Arch Virol* **121**(1-4), 9-17.
- Guilligay, D., Tarendeau, F., Resa-Infante, P., *et al.* (2008). The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2. *Nat Struct Mol Biol* **15**(5), 500-506.
- Guo, Y., Li, J., and Cheng, X. (1999). [Discovery of men infected by avian influenza A (H9N2) virus]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* **13**(2), 105-108.
- Guo, Z., Chen, L. M., Zeng, H., *et al.* (2007). NS1 protein of influenza A virus inhibits the function of intracytoplasmic pathogen sensor, RIG-I. *Am J Respir Cell Mol Biol* **36**(3), 263-269.
- Hao, L., Sakurai, A., Watanabe, T., *et al.* (2008). Drosophila RNAi screen identifies host genes important for influenza virus replication. *Nature* **454**(7206), 890-893.
- Hara, K., Schmidt, F. I., Crow, M., *et al.* (2006). Amino acid residues in the N-terminal region of the PA subunit of influenza A virus RNA polymerase play a critical role in protein stability, endonuclease activity, cap binding, and virion RNA promoter binding. *J Virol* **80**(16), 7789-7798.
- Hara, K., Shiota, M., Kido, H., *et al.* (2001). Influenza virus RNA polymerase PA subunit is a novel serine protease with Ser624 at the active site. *Genes Cells* **6**(2), 87-97.
- Harper, S. A., Fukuda, K., Uyeki, T. M., *et al.* (2004). Prevention and control of influenza: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* **53**(RR-6), 1-40.
- Harris, A., Forouhar, F., Qiu, S., *et al.* (2001). The crystal structure of the influenza matrix protein M1 at neutral pH: M1-M1 protein interfaces can rotate in the oligomeric structures of M1. *Virology* **289**(1), 34-44.
- Hartzog, G. A., Wada, T., Handa, H., *et al.* (1998). Evidence that Spt4, Spt5, and Spt6 control transcription elongation by RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **12**(3), 357-369.
- Hatada, E., and Fukuda, R. (1992). Binding of influenza A virus NS1 protein to dsRNA in vitro. *J Gen Virol* **73** ( Pt **12**), 3325-3329.
- Hatada, E., Hasegawa, M., Mukaigawa, J., *et al.* (1989). Control of influenza virus gene expression: quantitative analysis of each viral RNA species in infected cells. *J Biochem* **105**(4), 537-546.
- Hatada, E., Saito, S., and Fukuda, R. (1999). Mutant influenza viruses with a defective NS1 protein cannot block the activation of PKR in infected cells. *J Virol* **73**(3), 2425-2433.
- Hatada, E., Saito, S., Okishio, N., *et al.* (1997). Binding of the influenza virus NS1 protein to model genome RNAs. *J Gen Virol* **78** ( Pt **5**), 1059-1063.

- Hatada, E., Takizawa, T., and Fukuda, R. (1992). Specific binding of influenza A virus NS1 protein to the virus minus-sense RNA in vitro. *J Gen Virol* **73** ( Pt 1), 17-25.
- Hatta, M., Gao, P., Halfmann, P., et al. (2001). Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* **293**(5536), 1840-1842.
- Hay, A. J., Lomniczi, B., Bellamy, A. R., et al. (1977). Transcription of the influenza virus genome. *Virology* **83**(2), 337-355.
- Hay, A. J., Skehel, J. J., and McCauley, J. (1982). Characterization of influenza virus RNA complete transcripts. *Virology* **116**(2), 517-522.
- Helenius, A. (1992). Unpacking the incoming influenza virus. *Cell* **69**(4), 577-578.
- Hemerka, J. N., Wang, D., Weng, Y., et al. (2009). Detection and characterization of influenza A virus PA-PB2 interaction through a bimolecular fluorescence complementation assay. *J Virol* **83**(8), 3944-3955.
- Herlocher, M. L., Clavo, A. C., and Maassab, H. F. (1996). Sequence comparisons of A/AA/6/60 influenza viruses: mutations which may contribute to attenuation. *Virus Res* **42**(1-2), 11-25.
- Hillier, L. W., Miller, W., Birney, E., et al. (2004). Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature* **432**(7018), 695-716.
- Hirayama, E., Atagi, H., Hiraki, A., et al. (2004). Heat shock protein 70 is related to thermal inhibition of nuclear export of the influenza virus ribonucleoprotein complex. *J Virol* **78**(3), 1263-1270.
- Hirose, Y., and Manley, J. L. (2000). RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes Dev* **14**(12), 1415-1429.
- Hirose, Y., Tacke, R., and Manley, J. L. (1999). Phosphorylated RNA polymerase II stimulates pre-mRNA splicing. *Genes Dev* **13**(10), 1234-1239.
- Holsinger, L. J., and Lamb, R. A. (1991). Influenza virus M2 integral membrane protein is a homotetramer stabilized by formation of disulfide bonds. *Virology* **183**(1), 32-43.
- Holstege, F. C., van der Vliet, P. C., and Timmers, H. T. (1996). Opening of an RNA polymerase II promoter occurs in two distinct steps and requires the basal transcription factors IIE and IIH. *Embo J* **15**(7), 1666-1677.
- Homme, P. J., and Easterday, B. C. (1970). Avian influenza virus infections. I. Characteristics of influenza A-turkey-Wisconsin-1966 virus. *Avian Dis* **14**(1), 66-74.
- Honda, A., Mizumoto, K., and Ishihama, A. (1999). Two separate sequences of PB2 subunit constitute the RNA cap-binding site of influenza virus RNA polymerase. *Genes Cells* **4**(8), 475-485.
- Honda, A., Mizumoto, K., and Ishihama, A. (2002). Minimum molecular architectures for transcription and replication of the influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(20), 13166-13171.
- Honda, A., Mukaigawa, J., Yokoiyama, A., et al. (1990). Purification and molecular structure of RNA polymerase from influenza virus A/PR8. *J Biochem* **107**(4), 624-628.
- Honda, A., Okamoto, T., and Ishihama, A. (2007). Host factor Ebp1: selective inhibitor of influenza virus transcriptase.

- Genes Cells* **12**(2), 133-142.
- Honda, A., Ueda, K., Nagata, K., *et al.* (1988). RNA polymerase of influenza virus: role of NP in RNA chain elongation. *J Biochem* **104**(6), 1021-1026.
- Horimoto, T., and Kawaoka, Y. (1994). Reverse genetics provides direct evidence for a correlation of hemagglutinin cleavability and virulence of an avian influenza A virus. *J Virol* **68**(5), 3120-3128.
- Horne, R. W., Waterson, A. P., Wildy, P., *et al.* (1960). The structure and composition of the myxoviruses. I. Electron microscope studies of the structure of myxovirus particles by negative staining techniques. *Virology* **11**, 79-98.
- Howng, S. L., Hsu, H. C., Cheng, T. S., *et al.* (2004). A novel ninein-interaction protein, CGI-99, blocks ninein phosphorylation by GSK3 $\beta$  and is highly expressed in brain tumors. *FEBS Lett* **566**(1-3), 162-168.
- Hoyle, L., Horne, R. W., and Waterson, A. P. (1961). The structure and composition of the myxoviruses. II. Components released from the influenza virus particle by ether. *Virology* **13**, 448-459.
- Hsu, M. T., Parvin, J. D., Gupta, S., *et al.* (1987). Genomic RNAs of influenza viruses are held in a circular conformation in virions and in infected cells by a terminal panhandle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(22), 8140-8144.
- Huang, T. S., Palese, P., and Krystal, M. (1990). Determination of influenza virus proteins required for genome replication. *J Virol* **64**(11), 5669-5673.
- Huarte, M., Falcon, A., Nakaya, Y., *et al.* (2003). Threonine 157 of influenza virus PA polymerase subunit modulates RNA replication in infectious viruses. *J Virol* **77**(10), 6007-6013.
- Huarte, M., Sanz-Ezquerro, J. J., Roncal, F., *et al.* (2001). PA subunit from influenza virus polymerase complex interacts with a cellular protein with homology to a family of transcriptional activators. *J Virol* **75**(18), 8597-8604.
- Hughey, P. G., Roberts, P. C., Holsinger, L. J., *et al.* (1995). Effects of antibody to the influenza A virus M2 protein on M2 surface expression and virus assembly. *Virology* **212**(2), 411-421.
- Hulse-Post, D. J., Franks, J., Boyd, K., *et al.* (2007). Molecular changes in the polymerase genes (PA and PB1) associated with high pathogenicity of H5N1 influenza virus in mallard ducks. *J Virol* **81**(16), 8515-8524.
- Inglis, S. C., Barrett, T., Brown, C. M., *et al.* (1979). The smallest genome RNA segment of influenza virus contains two genes that may overlap. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(8), 3790-3794.
- Inglis, S. C., and Brown, C. M. (1981). Spliced and unspliced RNAs encoded by virion RNA segment 7 of influenza virus. *Nucleic Acids Res* **9**(12), 2727-2740.
- Inglis, S. C., Carroll, A. R., Lamb, R. A., *et al.* (1976). Polypeptides specified by the influenza virus genome I. Evidence for eight distinct gene products specified by fowl plague virus. *Virology* **74**(2), 489-503.
- Isaacs, A., and Andrewes, C. H. (1951). The spread of influenza; evidence from 1950-1951. *Br Med J* **2**(4737), 921-927.
- Isel, C., and Karn, J. (1999). Direct evidence that HIV-1 Tat stimulates

- RNA polymerase II carboxyl-terminal domain hyperphosphorylation during transcriptional elongation. *J Mol Biol* **290**(5), 929-941.
- Ito, T., Couceiro, J. N., Kelm, S., *et al.* (1998). Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol* **72**(9), 7367-7373.
- Iwatsuki-Horimoto, K., Horimoto, T., Noda, T., *et al.* (2006). The cytoplasmic tail of the influenza A virus M2 protein plays a role in viral assembly. *J Virol* **80**(11), 5233-5240.
- Jackson, D., Hossain, M. J., Hickman, D., *et al.* (2008). A new influenza virus virulence determinant: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(11), 4381-4386.
- Jackson, D. A., Caton, A. J., McCready, S. J., *et al.* (1982). Influenza virus RNA is synthesized at fixed sites in the nucleus. *Nature* **296**(5855), 366-368.
- Jiang, Y., and Price, D. H. (2004). Rescue of the TTF2 knockdown phenotype with an siRNA-resistant replacement vector. *Cell Cycle* **3**(9), 1151-1153.
- Jin, H., Zhou, H., Lu, B., *et al.* (2004). Imparting temperature sensitivity and attenuation in ferrets to A/Puerto Rico/8/34 influenza virus by transferring the genetic signature for temperature sensitivity from cold-adapted A/Ann Arbor/6/60. *J Virol* **78**(2), 995-998.
- Johnson, N. P., and Mueller, J. (2002). Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic. *Bull Hist Med* **76**(1), 105-115.
- Jones, I. M., Reay, P. A., and Philpott, K. L. (1986). Nuclear location of all three influenza polymerase proteins and a nuclear signal in polymerase PB2. *Embo J* **5**(9), 2371-2376.
- Jones, J. C., Phatnani, H. P., Haystead, T. A., *et al.* (2004). C-terminal repeat domain kinase I phosphorylates Ser2 and Ser5 of RNA polymerase II C-terminal domain repeats. *J Biol Chem* **279**(24), 24957-24964.
- Jorba, N., Area, E., and Ortin, J. (2008a). Oligomerization of the influenza virus polymerase complex in vivo. *J Gen Virol* **89**(Pt 2), 520-524.
- Jorba, N., Juarez, S., Torreira, E., *et al.* (2008b). Analysis of the interaction of influenza virus polymerase complex with human cell factors. *Proteomics* **8**(10), 2077-2088.
- Joseph, T., McAuliffe, J., Lu, B., *et al.* (2008). A live attenuated cold-adapted influenza A H7N3 virus vaccine provides protection against homologous and heterologous H7 viruses in mice and ferrets. *Virology* **378**(1), 123-132.
- Josset, L., Frobert, E., and Rosa-Calatrava, M. (2008). Influenza A replication and host nuclear compartments: many changes and many questions. *J Clin Virol* **43**(4), 381-390.
- Jove, R., and Manley, J. L. (1984). In vitro transcription from the adenovirus 2 major late promoter utilizing templates truncated at promoter-proximal sites. *J Biol Chem* **259**(13), 8513-8521.
- Kafasla, P., Patrino-Georgoula, M., Lewis, J. D., *et al.* (2002). Association of the 72/74-kDa proteins, members of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M group, with the pre-mRNA at early stages of spliceosome assembly. *Biochem J* **363**(Pt 3), 793-799.

- Kanai, Y., Dohmae, N., and Hirokawa, N. (2004). Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* **43**(4), 513-525.
- Kato, A., Mizumoto, K., and Ishihama, A. (1985). Purification and enzymatic properties of an RNA polymerase-RNA complex from influenza virus. *Virus Res* **3**(2), 115-127.
- Katze, M. G., and Krug, R. M. (1984). Metabolism and expression of RNA polymerase II transcripts in influenza virus-infected cells. *Mol Cell Biol* **4**(10), 2198-2206.
- Katze, M. G., and Krug, R. M. (1990). Translational control in influenza virus-infected cells. *Enzyme* **44**(1-4), 265-277.
- Kaverin, N. V., Varich, N. L., Surgay, V. V., *et al.* (1975). A quantitative estimation of poxvirus genome fraction transcribed as "early" and "late" mRNA. *Virology* **65**(1), 112-119.
- Kawaguchi, A., and Nagata, K. (2007). De novo replication of the influenza virus RNA genome is regulated by DNA replicative helicase, MCM. *Embo J* **26**(21), 4566-4575.
- Kawaguchi, A., Naito, T., and Nagata, K. (2005). Involvement of influenza virus PA subunit in assembly of functional RNA polymerase complexes. *J Virol* **79**(2), 732-744.
- Kettenberger, H., Armache, K. J., and Cramer, P. (2003). Architecture of the RNA polymerase II-TFIIS complex and implications for mRNA cleavage. *Cell* **114**(3), 347-357.
- Kida, H., Ito, T., Yasuda, J., *et al.* (1994). Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs. *J Gen Virol* **75** ( Pt 9), 2183-2188.
- Kiebler, M. A., and DesGroseillers, L. (2000). Molecular insights into mRNA transport and local translation in the mammalian nervous system. *Neuron* **25**(1), 19-28.
- Kiebler, M. A., Hemraj, I., Verkade, P., *et al.* (1999). The mammalian staufen protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport. *J Neurosci* **19**(1), 288-297.
- Kilbourne, E. (1969). Future influenza vaccines and the use of genetic recombinants. *Bull World Health Organ* **41**(3), 643-645.
- Kim, E., Du, L., Bregman, D. B., *et al.* (1997a). Splicing factors associate with hyperphosphorylated RNA polymerase II in the absence of pre-mRNA. *J Cell Biol* **136**(1), 19-28.
- Kim, H. J., Fodor, E., Brownlee, G. G., *et al.* (1997b). Mutational analysis of the RNA-fork model of the influenza A virus vRNA promoter in vivo. *J Gen Virol* **78** ( Pt 2), 353-357.
- Kim, T. K., Ebright, R. H., and Reinberg, D. (2000). Mechanism of ATP-dependent promoter melting by transcription factor IIH. *Science* **288**(5470), 1418-1422.
- Kimura, N., Nishida, M., Nagata, K., *et al.* (1992). Transcription of a recombinant influenza virus RNA in cells that can express the influenza virus RNA polymerase and nucleoprotein genes. *J Gen Virol* **73** ( Pt 6), 1321-1328.
- Kimura, Y., Sakai, F., Nakano, O., *et al.* (2002). The newly identified human nuclear protein NXP-2 possesses three distinct domains, the nuclear matrix-

- binding, RNA-binding, and coiled-coil domains. *J Biol Chem* **277**(23), 20611-20617.
- Kingsbury, D. W., Jones, I. M., and Murti, K. G. (1987). Assembly of influenza ribonucleoprotein in vitro using recombinant nucleoprotein. *Virology* **156**(2), 396-403.
- Klumpp, K., Ford, M. J., and Ruigrok, R. W. (1998). Variation in ATP requirement during influenza virus transcription. *J Gen Virol* **79** ( Pt 5), 1033-1045.
- Klumpp, K., Ruigrok, R. W., and Baudin, F. (1997). Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure. *Embo J* **16**(6), 1248-1257.
- Kobayashi, M., Toyoda, T., Adyshev, D. M., *et al.* (1994). Molecular dissection of influenza virus nucleoprotein: deletion mapping of the RNA binding domain. *J Virol* **68**(12), 8433-8436.
- Kobayashi, M., Toyoda, T., and Ishihama, A. (1996). Influenza virus PB1 protein is the minimal and essential subunit of RNA polymerase. *Arch Virol* **141**(3-4), 525-539.
- Kochs, G., Garcia-Sastre, A., and Martinez-Sobrido, L. (2007). Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein. *J Virol* **81**(13), 7011-7021.
- Kochs, G., and Haller, O. (1999a). GTP-bound human MxA protein interacts with the nucleocapsids of Thogoto virus (Orthomyxoviridae). *J Biol Chem* **274**(7), 4370-4376.
- Kochs, G., and Haller, O. (1999b). Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(5), 2082-2086.
- Kohrmann, M., Luo, M., Kaether, C., *et al.* (1999). Microtubule-dependent recruitment of Staufen-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons. *Mol Biol Cell* **10**(9), 2945-2953.
- Kolpashchikov, D. M., Honda, A., and Ishihama, A. (2004). Structure-function relationship of the influenza virus RNA polymerase: primer-binding site on the PB1 subunit. *Biochemistry* **43**(19), 5882-5887.
- Koopmans, M., Wilbrink, B., Conyn, M., *et al.* (2004). Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. *Lancet* **363**(9409), 587-593.
- Kramer, A. (1996). The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Annu Rev Biochem* **65**, 367-409.
- Krug, R. M., Alonso-Kaplen, F. V., Julkunen, I., and Katze, M. G. (1989). Expression and replication of the influenza virus genome. In "The influenza viruses." (Krug, R. M., Ed.), pp. 89-152. Plenum Press, New York.
- Krug, R. M., Broni, B. A., and Bouloy, M. (1979). Are the 5' ends of influenza viral mRNAs synthesized in vivo donated by host mRNAs? *Cell* **18**(2), 329-334.
- Krug, R. M., Broni, B. A., LaFiandra, A. J., *et al.* (1980). Priming and inhibitory activities of RNAs for the influenza viral transcriptase do not require base pairing with the virion template RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(10), 5874-5878.
- Krug, R. M., Ueda, M., and Palese, P. (1975). Temperature-sensitive mutants of influenza WSN virus defective in



- virus-specific RNA synthesis. *J Virol* **16**(4), 790-796.
- Krug, R. M., Yuan, W., Noah, D. L., *et al.* (2003). Intracellular warfare between human influenza viruses and human cells: the roles of the viral NS1 protein. *Virology* **309**(2), 181-189.
- Kurtz, J., Manvell, R. J., and Banks, J. (1996). Avian influenza virus isolated from a woman with conjunctivitis. *Lancet* **348**(9031), 901-902.
- Lai, C. H., Chou, C. Y., Ch'ang, L. Y., *et al.* (2000). Identification of novel human genes evolutionarily conserved in *Caenorhabditis elegans* by comparative proteomics. *Genome Res* **10**(5), 703-713.
- Lamb, R. A., and Choppin, P. W. (1977). Synthesis of influenza virus polypeptides in cells resistant to alpha-amanitin: evidence for the involvement of cellular RNA polymerase II in virus replication. *J Virol* **23**(3), 816-819.
- Lamb, R. A., and Choppin, P. W. (1979). Segment 8 of the influenza virus genome is unique in coding for two polypeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(10), 4908-4912.
- Lamb, R. A., and Choppin, P. W. (1981). Identification of a second protein (M2) encoded by RNA segment 7 of influenza virus. *Virology* **112**(2), 729-737.
- Lamb, R. A., and Choppin, P. W. (1983). The gene structure and replication of influenza virus. *Annu Rev Biochem* **52**, 467-506.
- Lamb, R. A., Choppin, P. W., Chanock, R. M., *et al.* (1980). Mapping of the two overlapping genes for polypeptides NS1 and NS2 on RNA segment 8 of influenza virus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(4), 1857-1861.
- Lamb, R. A., and Lai, C. J. (1980). Sequence of interrupted and uninterrupted mRNAs and cloned DNA coding for the two overlapping nonstructural proteins of influenza virus. *Cell* **21**(2), 475-485.
- Lamb, R. A., Lai, C. J., and Choppin, P. W. (1981). Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: colinear and interrupted mRNAs code for overlapping proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(7), 4170-4174.
- Li, K. S., Guan, Y., Wang, J., *et al.* (2004a). Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature* **430**(6996), 209-213.
- Li, M. L., Ramirez, B. C., and Krug, R. M. (1998). RNA-dependent activation of primer RNA production by influenza virus polymerase: different regions of the same protein subunit constitute the two required RNA-binding sites. *Embo J* **17**(19), 5844-5852.
- Li, M. L., Rao, P., and Krug, R. M. (2001). The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits. *Embo J* **20**(8), 2078-2086.
- Li, S., Liu, C., Klimov, A., *et al.* (1999). Recombinant influenza A virus vaccines for the pathogenic human A/Hong Kong/97 (H5N1) viruses. *J Infect Dis* **179**(5), 1132-1138.
- Li, S., Min, J. Y., Krug, R. M., *et al.* (2006). Binding of the influenza A virus NS1 protein to PKR mediates the inhibition of its activation by either PACT or double-stranded RNA. *Virology* **349**(1), 13-21.
- Li, S., Schulman, J., Itamura, S., *et al.* (1993). Glycosylation of neuraminidase

- determines the neurovirulence of influenza A/WSN/33 virus. *J Virol* **67**(11), 6667-6673.
- Li, W. X., Li, H., Lu, R., *et al.* (2004b). Interferon antagonist proteins of influenza and vaccinia viruses are suppressors of RNA silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(5), 1350-1355.
- Liang, Y., Hong, Y., and Parslow, T. G. (2005). cis-Acting packaging signals in the influenza virus PB1, PB2, and PA genomic RNA segments. *J Virol* **79**(16), 10348-10355.
- Liang, Y., Huang, T., Ly, H., *et al.* (2008). Mutational analyses of packaging signals in influenza virus PA, PB1, and PB2 genomic RNA segments. *J Virol* **82**(1), 229-236.
- Lin, C., Yang, L., Yang, J. J., *et al.* (2005). ATPase/helicase activities of p68 RNA helicase are required for pre-mRNA splicing but not for assembly of the spliceosome. *Mol Cell Biol* **25**(17), 7484-7493.
- Lin, Y. P., Shaw, M., Gregory, V., *et al.* (2000). Avian-to-human transmission of H9N2 subtype influenza A viruses: relationship between H9N2 and H5N1 human isolates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(17), 9654-9658.
- Lindblad-Toh, K., Wade, C. M., Mikkelsen, T. S., *et al.* (2005). Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* **438**(7069), 803-819.
- Lindstrom, D. L., Squazzo, S. L., Muster, N., *et al.* (2003). Dual roles for Spt5 in pre-mRNA processing and transcription elongation revealed by identification of Spt5-associated proteins. *Mol Cell Biol* **23**(4), 1368-1378.
- Liu, Z. R. (2002). p68 RNA helicase is an essential human splicing factor that acts at the U1 snRNA-5' splice site duplex. *Mol Cell Biol* **22**(15), 5443-5450.
- López-Turiso, J. A., Martinez, C., Tanaka, T., *et al.* (1990). The synthesis of influenza virus negative-strand RNA takes place in insoluble complexes present in the nuclear matrix fraction. *Virus Res* **16**(3), 325-337.
- Lu, Y., Qian, X. Y., and Krug, R. M. (1994). The influenza virus NS1 protein: a novel inhibitor of pre-mRNA splicing. *Genes Dev* **8**(15), 1817-1828.
- Lu, Y., Wambach, M., Katze, M. G., *et al.* (1995). Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation factor. *Virology* **214**(1), 222-228.
- Luo, G., Chung, J., and Palese, P. (1993). Alterations of the stalk of the influenza virus neuraminidase: deletions and insertions. *Virus Res* **29**(2), 141-153.
- Lutz, T., Stoger, R., and Nieto, A. (2006). CHD6 is a DNA-dependent ATPase and localizes at nuclear sites of mRNA synthesis. *FEBS Lett* **580**(25), 5851-5857.
- Luytjes, W., Krystal, M., Enami, M., *et al.* (1989). Amplification, expression, and packaging of foreign gene by influenza virus. *Cell* **59**(6), 1107-1113.
- Ma, K., Roy, A. M., and Whittaker, G. R. (2001). Nuclear export of influenza virus ribonucleoproteins: identification of an export intermediate at the nuclear periphery. *Virology* **282**(2), 215-220.
- Maassab, H. F. (1967). Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25 degrees c. *Nature* **213**(5076), 612-614.



- Maassab, H. F. (1969). Biologic and immunologic characteristics of cold-adapted influenza virus. *J Immunol* **102**(3), 728-732.
- Maassab, H. F., and Bryant, M. L. (1999). The development of live attenuated cold-adapted influenza virus vaccine for humans. *Rev Med Virol* **9**(4), 237-244.
- Mahy, B. W. J. (1983). Genetics of influenza viruses (Palese, P., and Kingsbury, D. W., Ed.), pp. 192-253. Springer Verlag, Wien.
- Maines, T. R., Lu, X. H., Erb, S. M., *et al.* (2005). Avian influenza (H5N1) viruses isolated from humans in Asia in 2004 exhibit increased virulence in mammals. *J Virol* **79**(18), 11788-11800.
- Manley, J. L., and Tacke, R. (1996). SR proteins and splicing control. *Genes Dev* **10**(13), 1569-1579.
- Marion, R. M., Zurcher, T., de la Luna, S., *et al.* (1997). Influenza virus NS1 protein interacts with viral transcription-replication complexes in vivo. *J Gen Virol* **78** ( Pt 10), 2447-2451.
- Martín-Benito, J., Area, E., Ortega, J., *et al.* (2001). Three-dimensional reconstruction of a recombinant influenza virus ribonucleoprotein particle. *EMBO Rep* **2**(4), 313-317.
- Martin, K., and Helenius, A. (1991). Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell* **67**(1), 117-130.
- Matrosovich, M. N., Matrosovich, T. Y., Gray, T., *et al.* (2004). Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(13), 4620-4624.
- Mayer, D., Molawi, K., Martinez-Sobrido, L., *et al.* (2007). Identification of cellular interaction partners of the influenza virus ribonucleoprotein complex and polymerase complex using proteomic-based approaches. *J Proteome Res* **6**(2), 672-682.
- Mazur, I., Anhlán, D., Mitzner, D., *et al.* (2008). The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein. *Cell Microbiol* **10**(5), 1140-1152.
- McAuley, J. L., Hornung, F., Boyd, K. L., *et al.* (2007). Expression of the 1918 influenza A virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia. *Cell Host Microbe* **2**(4), 240-249.
- McCown, M. F., and Pekosz, A. (2006). Distinct domains of the influenza A virus M2 protein cytoplasmic tail mediate binding to the M1 protein and facilitate infectious virus production. *J Virol* **80**(16), 8178-8189.
- McCracken, S., Fong, N., Yankulov, K., *et al.* (1997). The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature* **385**(6614), 357-361.
- Medcalf, L., Poole, E., Elton, D., *et al.* (1999). Temperature-sensitive lesions in two influenza A viruses defective for replicative transcription disrupt RNA binding by the nucleoprotein. *J Virol* **73**(9), 7349-7356.
- Meinhart, A., Kamenski, T., Hoepfner, S., *et al.* (2005). A structural perspective of CTD function. *Genes Dev* **19**(12), 1401-1415.
- Mena, I., de la Luna, S., Albo, C., *et al.* (1994). Synthesis of biologically active influenza virus core proteins using a

- vaccinia virus-T7 RNA polymerase expression system. *J Gen Virol* **75** ( Pt 8), 2109-2114.
- Mena, I., Vivo, A., Perez, E., *et al.* (1996). Rescue of a synthetic chloramphenicol acetyltransferase RNA into influenza virus-like particles obtained from recombinant plasmids. *J Virol* **70**(8), 5016-5024.
- Mibayashi, M., Martinez-Sobrido, L., Loo, Y. M., *et al.* (2007). Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus. *J Virol* **81**(2), 514-524.
- Mikkelsen, T. S., Hillier, L. W., Eichler, E. E., *et al.* (2005). Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome. *Nature* **437**(7055), 69-87.
- Mikkelsen, T. S., Wakefield, M. J., Aken, B., *et al.* (2007). Genome of the marsupial *Monodelphis domestica* reveals innovation in non-coding sequences. *Nature* **447**(7141), 167-177.
- Min, J. Y., and Krug, R. M. (2006). The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase/RNase L pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(18), 7100-7105.
- Momose, F., Basler, C. F., O'Neill, R. E., *et al.* (2001). Cellular splicing factor RAF-2p48/NPI-5/BAT1/UAP56 interacts with the influenza virus nucleoprotein and enhances viral RNA synthesis. *J Virol* **75**(4), 1899-1908.
- Momose, F., Handa, H., and Nagata, K. (1996). Identification of host factors that regulate the influenza virus RNA polymerase activity. *Biochimie* **78**(11-12), 1103-1108.
- Momose, F., Kikuchi, Y., Komase, K., *et al.* (2007). Visualization of microtubule-mediated transport of influenza viral progeny ribonucleoprotein. *Microbes Infect* **9**(12-13), 1422-1433.
- Momose, F., Naito, T., Yano, K., *et al.* (2002). Identification of Hsp90 as a stimulatory host factor involved in influenza virus RNA synthesis. *J Biol Chem* **277**(47), 45306-45314.
- Moore, M. J., and Sharp, P. A. (1993). Evidence for two active sites in the spliceosome provided by stereochemistry of pre-mRNA splicing. *Nature* **365**(6444), 364-368.
- Morley, S. J., Curtis, P. S., and Pain, V. M. (1997). eIF4G: translation's mystery factor begins to yield its secrets. *Rna* **3**(10), 1085-1104.
- Mortillaro, M. J., Blencowe, B. J., Wei, X., *et al.* (1996). A hyperphosphorylated form of the large subunit of RNA polymerase II is associated with splicing complexes and the nuclear matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(16), 8253-8257.
- Mouland, A. J., Mercier, J., Luo, M., *et al.* (2000). The double-stranded RNA-binding protein Staufen is incorporated in human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in genomic RNA encapsidation. *J Virol* **74**(12), 5441-5451.
- Mowshowitz, S. L. (1981). RNA synthesis of temperature-sensitive mutants of WSN influenza virus. In "The replication of Negative Stranded viruses" (Bishop, D. H. L., and Compans, R.W., Ed.), pp. 317-323. Elsevier, New York.
- Mukaigawa, J., and Nayak, D. P. (1991). Two signals mediate nuclear localization of influenza virus (A/WSN/33) polymerase basic protein 2. *J Virol*

- 65**(1), 245-253.
- Muller, R., Poch, O., Delarue, M., *et al.* (1994). Rift Valley fever virus L segment: correction of the sequence and possible functional role of newly identified regions conserved in RNA-dependent polymerases. *J Gen Virol* **75** ( Pt 6), 1345-1352.
- Munster, V. J., de Wit, E., van Riel, D., *et al.* (2007). The molecular basis of the pathogenicity of the Dutch highly pathogenic human influenza A H7N7 viruses. *J Infect Dis* **196**(2), 258-265.
- Muramoto, Y., Takada, A., Fujii, K., *et al.* (2006). Hierarchy among viral RNA (vRNA) segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions. *J Virol* **80**(5), 2318-2325.
- Murayama, R., Harada, Y., Shibata, T., *et al.* (2007). Influenza A virus non-structural protein 1 (NS1) interacts with cellular multifunctional protein nucleolin during infection. *Biochem Biophys Res Commun* **362**(4), 880-885.
- Naffakh, N., Massin, P., Escriou, N., *et al.* (2000). Genetic analysis of the compatibility between polymerase proteins from human and avian strains of influenza A viruses. *J Gen Virol* **81**(Pt 5), 1283-1291.
- Naffakh, N., Massin, P., and van der Werf, S. (2001). The transcription/replication activity of the polymerase of influenza A viruses is not correlated with the level of proteolysis induced by the PA subunit. *Virology* **285**(2), 244-252.
- Naito, T., Kiyasu, Y., Sugiyama, K., *et al.* (2007a). An influenza virus replicon system in yeast identified Tat-SF1 as a stimulatory host factor for viral RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(46), 18235-18240.
- Naito, T., Momose, F., Kawaguchi, A., *et al.* (2007b). Involvement of Hsp90 in assembly and nuclear import of influenza virus RNA polymerase subunits. *J Virol* **81**(3), 1339-1349.
- Nakagawa, Y., Oda, K., and Nakada, S. (1996). The PB1 subunit alone can catalyze cRNA synthesis, and the PA subunit in addition to the PB1 subunit is required for viral RNA synthesis in replication of the influenza virus genome. *J Virol* **70**(9), 6390-6394.
- Nath, S. T., and Nayak, D. P. (1990). Function of two discrete regions is required for nuclear localization of polymerase basic protein 1 of A/WSN/33 influenza virus (H1 N1). *Mol Cell Biol* **10**(8), 4139-4145.
- Nayak, D. P., Hui, E. K., and Barman, S. (2004). Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res* **106**(2), 147-165.
- Nayak, D. P., Sivasubramanian, N., Davis, A. R., *et al.* (1982). Complete sequence analyses show that two defective interfering influenza viral RNAs contain a single internal deletion of a polymerase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(7), 2216-2220.
- Nemeroff, M. E., Barabino, S. M., Li, Y., *et al.* (1998). Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3'end formation of cellular pre-mRNAs. *Mol Cell* **1**(7), 991-1000.
- Neumann, G., Castrucci, M. R., and Kawaoka, Y. (1997). Nuclear import and export of influenza virus nucleoprotein. *J Virol* **71**(12), 9690-9700.
- Neumann, G., Hughes, M. T., and Kawaoka, Y. (2000). Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear

- export through NES-independent interaction with hCRM1. *Embo J* **19**(24), 6751-6758.
- Neumann, G., and Kawaoka, Y. (2006). Host range restriction and pathogenicity in the context of influenza pandemic. *Emerg Infect Dis* **12**(6), 881-886.
- Neumann, G., Watanabe, T., Ito, H., *et al.* (1999). Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(16), 9345-9350.
- Nicholls, J. M., Chan, R. W., Russell, R. J., *et al.* (2008). Evolving complexities of influenza virus and its receptors. *Trends Microbiol* **16**(4), 149-157.
- Nieto, A., de la Luna, S., Barcena, J., *et al.* (1994). Complex structure of the nuclear translocation signal of influenza virus polymerase PA subunit. *J Gen Virol* **75** ( Pt 1), 29-36.
- Nieto, A., de la Luna, S., Barcena, J., *et al.* (1992). Nuclear transport of influenza virus polymerase PA protein. *Virus Res* **24**(1), 65-75.
- Noda, T., Sagara, H., Yen, A., *et al.* (2006). Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature* **439**(7075), 490-492.
- Noton, S. L., Medcalf, E., Fisher, D., *et al.* (2007). Identification of the domains of the influenza A virus M1 matrix protein required for NP binding, oligomerization and incorporation into virions. *J Gen Virol* **88**(Pt 8), 2280-2290.
- O'Neill, R. E., Jaskunas, R., Blobel, G., *et al.* (1995). Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import. *J Biol Chem* **270**(39), 22701-22704.
- O'Neill, R. E., Talon, J., and Palese, P. (1998). The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *Embo J* **17**(1), 288-296.
- Ochoa, M., Barcena, J., de la Luna, S., *et al.* (1995). Epitope mapping of cross-reactive monoclonal antibodies specific for the influenza A virus PA and PB2 polypeptides. *Virus Res* **37**(3), 305-315.
- Ohrmalm, C., and Akusjarvi, G. (2006). Cellular splicing and transcription regulatory protein p32 represses adenovirus major late transcription and causes hyperphosphorylation of RNA polymerase II. *J Virol* **80**(10), 5010-5020.
- Ohtsu, Y., Honda, Y., Sakata, Y., *et al.* (2002). Fine mapping of the subunit binding sites of influenza virus RNA polymerase. *Microbiol Immunol* **46**(3), 167-175.
- Okuhara, K., Ohta, K., Seo, H., *et al.* (1999). A DNA unwinding factor involved in DNA replication in cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *Curr Biol* **9**(7), 341-350.
- Orphanides, G., Lagrange, T., and Reinberg, D. (1996). The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev* **10**(21), 2657-2683.
- Orphanides, G., Wu, W. H., Lane, W. S., *et al.* (1999). The chromatin-specific transcription elongation factor FACT comprises human SPT16 and SSRP1 proteins. *Nature* **400**(6741), 284-288.
- Ortega, J., Martin-Benito, J., Zurcher, T., *et al.* (2000). Ultrastructural and functional analyses of recombinant influenza virus ribonucleoproteins suggest dimerization of nucleoprotein during virus amplification. *J Virol* **74**(1), 156-163.
- Ortín, J., Najera, R., Lopez, C., *et al.*

- (1980). Genetic variability of Hong Kong (H3N2) influenza viruses: spontaneous mutations and their location in the viral genome. *Gene* **11**(3-4), 319-331.
- Ozawa, M., Maeda, J., Iwatsuki-Horimoto, K., *et al.* (2009). Nucleotide sequence requirements at the 5' end of the influenza A virus M RNA segment for efficient virus replication. *J Virol* **83**(7), 3384-3388.
- Palese, P., and Shaw, M. (2006). Orthomyxoviruses: the viruses and their replication. In "Fields Virology, 5th ed" (Knipe, D. M., and Howley, P.M., Ed.), Vol. vol. 2, pp. 1647-1689. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Palese, P., and Compans, R. W. (1976). Inhibition of influenza virus replication in tissue culture by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-trifluoroacetylneuraminic acid (FANA): mechanism of action. *J Gen Virol* **33**(1), 159-163.
- Palese, P., Tobita, K., Ueda, M., *et al.* (1974). Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology* **61**(2), 397-410.
- Pappas, C., Aguilar, P. V., Basler, C. F., *et al.* (2008). Single gene reassortants identify a critical role for PB1, HA, and NA in the high virulence of the 1918 pandemic influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(8), 3064-3069.
- Park, Y. W., and Katze, M. G. (1995). Translational control by influenza virus. Identification of cis-acting sequences and trans-acting factors which may regulate selective viral mRNA translation. *J Biol Chem* **270**(47), 28433-28439.
- Park, Y. W., Wilusz, J., and Katze, M. G. (1999). Regulation of eukaryotic protein synthesis: selective influenza viral mRNA translation is mediated by the cellular RNA-binding protein GRSF-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(12), 6694-6699.
- Pei, Y., Schwer, B., and Shuman, S. (2003). Interactions between fission yeast Cdk9, its cyclin partner Pch1, and mRNA capping enzyme Pct1 suggest an elongation checkpoint for mRNA quality control. *J Biol Chem* **278**(9), 7180-7188.
- Pei, Y., and Shuman, S. (2002). Interactions between fission yeast mRNA capping enzymes and elongation factor Spt5. *J Biol Chem* **277**(22), 19639-19648.
- Peiris, J. S., de Jong, M. D., and Guan, Y. (2007). Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health. *Clin Microbiol Rev* **20**(2), 243-267.
- Peiris, J. S., Guan, Y., Markwell, D., *et al.* (2001). Cocirculation of avian H9N2 and contemporary "human" H3N2 influenza A viruses in pigs in southeastern China: potential for genetic reassortment? *J Virol* **75**(20), 9679-9686.
- Peiris, M., Yuen, K. Y., Leung, C. W., *et al.* (1999). Human infection with influenza H9N2. *Lancet* **354**(9182), 916-917.
- Penn, C. R., Blaas, D., Kuechler, E., *et al.* (1982). Identification of the cap-binding protein of two strains of influenza A/FPV. *J Gen Virol* **62** (Pt 1), 177-180.
- Perales, B., and Ortin, J. (1997). The influenza A virus PB2 polymerase subunit is required for the replication of viral RNA. *J Virol* **71**(2), 1381-1385.
- Perales, B., Sanz-Ezquerro, J. J., Gastaminza, P., *et al.* (2000). The replication activity of influenza virus polymerase is linked to the capacity of the PA subunit to induce proteolysis. *J*

- Viol* **74**(3), 1307-1312.
- Pérez-González, A. (2007). Participación de la proteína hCLE en la expresión génica celular. Implicaciones en la infección por el virus de la gripe. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Pérez-González, A., Rodríguez, A., Huarte, M., *et al.* (2006). hCLE/CGI-99, a human protein that interacts with the influenza virus polymerase, is a mRNA transcription modulator. *J Mol Biol* **362**(5), 887-900.
- Perez, D. R., and Donis, R. O. (1995). A 48-amino-acid region of influenza A virus PB1 protein is sufficient for complex formation with PA. *J Virol* **69**(11), 6932-6939.
- Perez, D. R., and Donis, R. O. (1998). The matrix 1 protein of influenza A virus inhibits the transcriptase activity of a model influenza reporter genome in vivo. *Virology* **249**(1), 52-61.
- Perez, D. R., and Donis, R. O. (2001). Functional analysis of PA binding by influenza a virus PB1: effects on polymerase activity and viral infectivity. *J Virol* **75**(17), 8127-8136.
- Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C. P., *et al.* (2006). RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* **314**(5801), 997-1001.
- Pinto, L. H., Holsinger, L. J., and Lamb, R. A. (1992). Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* **69**(3), 517-528.
- Plotch, S. J., Bouloy, M., and Krug, R. M. (1979). Transfer of 5'-terminal cap of globin mRNA to influenza viral complementary RNA during transcription in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(4), 1618-1622.
- Plotch, S. J., Bouloy, M., Ulmanen, I., *et al.* (1981). A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell* **23**(3), 847-858.
- Poch, O., Sauvaget, I., Delarue, M., *et al.* (1989). Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *Embo J* **8**(12), 3867-3874.
- Poole, E., Elton, D., Medcalf, L., *et al.* (2004). Functional domains of the influenza A virus PB2 protein: identification of NP- and PB1-binding sites. *Virology* **321**(1), 120-133.
- Poole, E. L., Medcalf, L., Elton, D., *et al.* (2007). Evidence that the C-terminal PB2-binding region of the influenza A virus PB1 protein is a discrete alpha-helical domain. *FEBS Lett* **581**(27), 5300-5306.
- Poon, L. L., Fodor, E., and Brownlee, G. G. (2000). Polyuridylated mRNA synthesized by a recombinant influenza virus is defective in nuclear export. *J Virol* **74**(1), 418-427.
- Poon, L. L., Pritlove, D. C., Fodor, E., *et al.* (1999). Direct evidence that the poly(A) tail of influenza A virus mRNA is synthesized by reiterative copying of a U track in the virion RNA template. *J Virol* **73**(4), 3473-3476.
- Proudfoot, N. J. (1989). How RNA polymerase II terminates transcription in higher eukaryotes. *Trends Biochem Sci* **14**(3), 105-110.
- Puthavathana, P., Auewarakul, P., Charoenying, P. C., *et al.* (2005). Molecular characterization of the complete genome of human influenza



- H5N1 virus isolates from Thailand. *J Gen Virol* **86**(Pt 2), 423-433.
- Qian, X. Y., Alonso-Caplen, F., and Krug, R. M. (1994). Two functional domains of the influenza virus NS1 protein are required for regulation of nuclear export of mRNA. *J Virol* **68**(4), 2433-2441.
- Qiu, Y., and Krug, R. M. (1994). The influenza virus NS1 protein is a poly(A)-binding protein that inhibits nuclear export of mRNAs containing poly(A). *J Virol* **68**(4), 2425-2432.
- Qiu, Y., Nemeroff, M., and Krug, R. M. (1995). The influenza virus NS1 protein binds to a specific region in human U6 snRNA and inhibits U6-U2 and U6-U4 snRNA interactions during splicing. *Rna* **1**(3), 304-316.
- Rappsilber, J., Ryder, U., Lamond, A. I., *et al.* (2002). Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Res* **12**(8), 1231-1245.
- Rasmussen, E. B., and Lis, J. T. (1993). In vivo transcriptional pausing and cap formation on three *Drosophila* heat shock genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(17), 7923-7927.
- Regan, J. F., Liang, Y., and Parslow, T. G. (2006). Defective assembly of influenza A virus due to a mutation in the polymerase subunit PA. *J Virol* **80**(1), 252-261.
- Resa-Infante, P., Jorba, N., Zamarreno, N., *et al.* (2008). The host-dependent interaction of alpha-importins with influenza PB2 polymerase subunit is required for virus RNA replication. *PLoS ONE* **3**(12), e3904.
- Rice, S. A., Long, M. C., Lam, V., *et al.* (1995). Herpes simplex virus immediate-early protein ICP22 is required for viral modification of host RNA polymerase II and establishment of the normal viral transcription program. *J Virol* **69**(9), 5550-5559.
- Rice, S. A., Long, M. C., Lam, V., *et al.* (1994). RNA polymerase II is aberrantly phosphorylated and localized to viral replication compartments following herpes simplex virus infection. *J Virol* **68**(2), 988-1001.
- Richards, S., Gibbs, R. A., Weinstock, G. M., *et al.* (2008). The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature* **452**(7190), 949-955.
- Richardson, J. C., and Akkina, R. K. (1991). NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells. *Arch Virol* **116**(1-4), 69-80.
- Robb, N. C., Smith, M., Vreede, F. T., *et al.* (2009). The NS2/NEP Protein Regulates Transcription and Replication of the Influenza Virus RNA Genome. *J Gen Virol*.
- Roberts, P. C., Lamb, R. A., and Compans, R. W. (1998). The M1 and M2 proteins of influenza A virus are important determinants in filamentous particle formation. *Virology* **240**(1), 127-137.
- Robertson, J. S. (1979). 5' and 3' terminal nucleotide sequences of the RNA genome segments of influenza virus. *Nucleic Acids Res* **6**(12), 3745-3757.
- Rogers, G. N., and Paulson, J. C. (1983). Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology* **127**(2), 361-373.
- Rogers, G. N., Paulson, J. C., Daniels, R. S., *et al.* (1983). Single amino acid substitutions in influenza haemagglutinin

- change receptor binding specificity. *Nature* **304**(5921), 76-78.
- Rolling, T., Koerner, I., Zimmermann, P., *et al.* (2009). Adaptive mutations resulting in enhanced polymerase activity contribute to high virulence of influenza A virus in mice. *J Virol*.
- Romanos, M. A., and Hay, A. J. (1984). Identification of the influenza virus transcriptase by affinity-labeling with pyridoxal 5'-phosphate. *Virology* **132**(1), 110-117.
- Rosendorff, A., Sakakibara, S., Lu, S., *et al.* (2006). NXP-2 association with SUMO-2 depends on lysines required for transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(14), 5308-5313.
- Rott, R., and Scholtissek, C. (1970). Specific inhibition of influenza replication by alpha-amanitin. *Nature* **228**(5266), 56.
- Ruigrok, R. W., and Baudin, F. (1995). Structure of influenza virus ribonucleoprotein particles. II. Purified RNA-free influenza virus ribonucleoprotein forms structures that are indistinguishable from the intact influenza virus ribonucleoprotein particles. *J Gen Virol* **76** ( Pt 4), 1009-1014.
- Salomon, R., Franks, J., Govorkova, E. A., *et al.* (2006). The polymerase complex genes contribute to the high virulence of the human H5N1 influenza virus isolate A/Vietnam/1203/04. *J Exp Med* **203**(3), 689-697.
- Salvatore, M., Basler, C. F., Parisien, J. P., *et al.* (2002). Effects of influenza A virus NS1 protein on protein expression: the NS1 protein enhances translation and is not required for shutoff of host protein synthesis. *J Virol* **76**(3), 1206-1212.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). "Molecular cloning. A laboratory manual." Second Edition ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanz-Ezquerro, J. J., de la Luna, S., Ortin, J., *et al.* (1995). Individual expression of influenza virus PA protein induces degradation of coexpressed proteins. *J Virol* **69**(4), 2420-2426.
- Sanz-Ezquerro, J. J., Fernandez Santaren, J., Sierra, T., *et al.* (1998). The PA influenza virus polymerase subunit is a phosphorylated protein. *J Gen Virol* **79** ( Pt 3), 471-478.
- Sanz-Ezquerro, J. J., Zurcher, T., de la Luna, S., *et al.* (1996). The amino-terminal one-third of the influenza virus PA protein is responsible for the induction of proteolysis. *J Virol* **70**(3), 1905-1911.
- Sato, Y., Yoshioka, K., Suzuki, C., *et al.* (2003). Localization of influenza virus proteins to nuclear dot 10 structures in influenza virus-infected cells. *Virology* **310**(1), 29-40.
- Satterly, N., Tsai, P. L., van Deursen, J., *et al.* (2007). Influenza virus targets the mRNA export machinery and the nuclear pore complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(6), 1853-1858.
- Scheiffele, P., Rietveld, A., Wilk, T., *et al.* (1999). Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane. *J Biol Chem* **274**(4), 2038-2044.
- Schickli, J. H., Flandorfer, A., Nakaya, T., *et al.* (2001). Plasmid-only rescue of influenza A virus vaccine candidates. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**(1416), 1965-1973.
- Scholtissek, C., and Becht, H. (1971).



- Binding of ribonucleic acids to the RNP-antigen protein of influenza viruses. *J Gen Virol* **10**(1), 11-16.
- Scholtissek, C., and Bowles, A. L. (1975). Isolation and characterization of temperature-sensitive mutants of fowl plague virus. *Virology* **67**(2), 576-587.
- Schroeder, C., Heider, H., Moncke-Buchner, E., *et al.* (2005). The influenza virus ion channel and maturation cofactor M2 is a cholesterol-binding protein. *Eur Biophys J* **34**(1), 52-66.
- Schroeder, S. C., Schwer, B., Shuman, S., *et al.* (2000). Dynamic association of capping enzymes with transcribing RNA polymerase II. *Genes Dev* **14**(19), 2435-2440.
- Schuster, E. F., and Stoger, R. (2002). CHD5 defines a new subfamily of chromodomain-SWI2/SNF2-like helicases. *Mamm Genome* **13**(2), 117-119.
- Seo, S. H., Hoffmann, E., and Webster, R. G. (2002). Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. *Nat Med* **8**(9), 950-954.
- Seo, S. H., Hoffmann, E., and Webster, R. G. (2004). The NS1 gene of H5N1 influenza viruses circumvents the host anti-viral cytokine responses. *Virus Res* **103**(1-2), 107-113.
- Sha, B., and Luo, M. (1997). Structure of a bifunctional membrane-RNA binding protein, influenza virus matrix protein M1. *Nat Struct Biol* **4**(3), 239-244.
- Shapiro, G. I., Gurney, T., Jr., and Krug, R. M. (1987). Influenza virus gene expression: control mechanisms at early and late times of infection and nuclear-cytoplasmic transport of virus-specific RNAs. *J Virol* **61**(3), 764-773.
- Shapiro, G. I., and Krug, R. M. (1988). Influenza virus RNA replication in vitro: synthesis of viral template RNAs and virion RNAs in the absence of an added primer. *J Virol* **62**(7), 2285-2290.
- Shaw, M. L., Stone, K. L., Colangelo, C. M., *et al.* (2008). Cellular proteins in influenza virus particles. *PLoS Pathog* **4**(6), e1000085.
- Sheng, M., and Sala, C. (2001). PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu Rev Neurosci* **24**, 1-29.
- Shi, L., Galarza, J. M., and Summers, D. F. (1996). Recombinant-baculovirus-expressed PB2 subunit of the influenza A virus RNA polymerase binds cap groups as an isolated subunit. *Virus Res* **42**(1-2), 1-9.
- Shimizu, K., Handa, H., Nakada, S., *et al.* (1994). Regulation of influenza virus RNA polymerase activity by cellular and viral factors. *Nucleic Acids Res* **22**(23), 5047-5053.
- Shimizu, K., Iguchi, A., Gomyou, R., *et al.* (1999). Influenza virus inhibits cleavage of the HSP70 pre-mRNAs at the polyadenylation site. *Virology* **254**(2), 213-219.
- Shinya, K., Watanabe, S., Ito, T., *et al.* (2007). Adaptation of an H7N7 equine influenza A virus in mice. *J Gen Virol* **88**(Pt 2), 547-553.
- Shope, R. (1931). Swine influenza. III. Filtration experiments and etiology. *J Exp Med* **54**, 373-380.
- Simpson-Holley, M., Ellis, D., Fisher, D., *et al.* (2002). A functional link between the actin cytoskeleton and lipid rafts during budding of filamentous influenza virions. *Virology* **301**(2), 212-225.
- Skehel, J. J., and Hay, A. J. (1978). Nucleotide sequences at the 5' termini

- of influenza virus RNAs and their transcripts. *Nucleic Acids Res* **5**(4), 1207-1219.
- Sliter, T. J., and Gilbert, L. I. (1992). Developmental arrest and ecdysteroid deficiency resulting from mutations at the *dre4* locus of *Drosophila*. *Genetics* **130**(3), 555-568.
- Smith, G. L., and Hay, A. J. (1982). Replication of the influenza virus genome. *Virology* **118**(1), 96-108.
- Smith, G. L., Levin, J. Z., Palese, P., *et al.* (1987). Synthesis and cellular location of the ten influenza polypeptides individually expressed by recombinant vaccinia viruses. *Virology* **160**(2), 336-345.
- Smith, W., Andrewes, C.H. and Laidlaw, P.P. (1933). A virus obtained from influenza patients. *Smith, W., Andrewes, C.H. and Laidlaw, P.P. (1933) A virus obtained from influenza patients. Lancet*, 1, 66-68. **1**, 66-68.
- Snyder, M. H., Betts, R. F., DeBorde, D., *et al.* (1988). Four viral genes independently contribute to attenuation of live influenza A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) cold-adapted reassortant virus vaccines. *J Virol* **62**(2), 488-495.
- Snyder, M. H., Clements, M. L., De Borde, D., *et al.* (1985). Attenuation of wild-type human influenza A virus by acquisition of the PA polymerase and matrix protein genes of influenza A/Ann Arbor/6/60 cold-adapted donor virus. *J Clin Microbiol* **22**(5), 719-725.
- Snyder, M. H., London, W. T., Tierney, E. L., *et al.* (1986). Restricted replication of a cold-adapted reassortant influenza A virus in the lower respiratory tract of chimpanzees. *J Infect Dis* **154**(2), 370-371.
- Spooner, L. L., and Barry, R. D. (1977). Participation of DNA-dependent RNA polymerase II in replication of influenza viruses. *Nature* **268**(5621), 650-652.
- Staeheli, P., Grob, R., Meier, E., *et al.* (1988). Influenza virus-susceptible mice carry Mx genes with a large deletion or a nonsense mutation. *Mol Cell Biol* **8**(10), 4518-4523.
- Stegmann, T., Booy, F. P., and Wilschut, J. (1987a). Effects of low pH on influenza virus. Activation and inactivation of the membrane fusion capacity of the hemagglutinin. *J Biol Chem* **262**(36), 17744-17749.
- Stegmann, T., Morselt, H. W., Scholma, J., *et al.* (1987b). Fusion of influenza virus in an intracellular acidic compartment measured by fluorescence dequenching. *Biochim Biophys Acta* **904**(1), 165-170.
- Subbarao, E. K., London, W., and Murphy, B. R. (1993). A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *J Virol* **67**(4), 1761-1764.
- Subbarao, K., Klimov, A., Katz, J., *et al.* (1998). Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* **279**(5349), 393-396.
- Suguitan, A. L., Jr., McAuliffe, J., Mills, K. L., *et al.* (2006). Live, attenuated influenza A H5N1 candidate vaccines provide broad cross-protection in mice and ferrets. *PLoS Med* **3**(9), e360.
- Sun, Z. W., and Hampsey, M. (1996). Synthetic enhancement of a TFIIB defect by a mutation in SSU72, an essential yeast gene encoding a novel protein that affects transcription start site selection in vivo. *Mol Cell Biol* **16**(4),

- 1557-1566.
- Takahashi, K., Yoshida, N., Murakami, N., *et al.* (2007). Dynamic regulation of p53 subnuclear localization and senescence by MORC3. *Mol Biol Cell* **18**(5), 1701-1709.
- Takizawa, N., Watanabe, K., Nouno, K., *et al.* (2006). Association of functional influenza viral proteins and RNAs with nuclear chromatin and sub-chromatin structure. *Microbes Infect* **8**(3), 823-833.
- Tamrakar, S., Kapasi, A. J., and Spector, D. H. (2005). Human cytomegalovirus infection induces specific hyperphosphorylation of the carboxyl-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II that is associated with changes in the abundance, activity, and localization of cdk9 and cdk7. *J Virol* **79**(24), 15477-15493.
- Tan, S. L., and Katze, M. G. (1998). Biochemical and genetic evidence for complex formation between the influenza A virus NS1 protein and the interferon-induced PKR protein kinase. *J Interferon Cytokine Res* **18**(9), 757-766.
- Tang, S. J., Meulemans, D., Vazquez, L., *et al.* (2001). A role for a rat homolog of staufen in the transport of RNA to neuronal dendrites. *Neuron* **32**(3), 463-475.
- Tarendeau, F., Boudet, J., Guilligay, D., *et al.* (2007). Structure and nuclear import function of the C-terminal domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *Nat Struct Mol Biol* **14**(3), 229-233.
- Taubenberger, J. K., Reid, A. H., Lourens, R. M., *et al.* (2005). Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature* **437**(7060), 889-893.
- Thierry, F., and Danos, O. (1982). Use of specific single stranded DNA probes cloned in M13 to study the RNA synthesis of four temperature-sensitive mutants of HK/68 influenza virus. *Nucleic Acids Res* **10**(9), 2925-2938.
- Thomas, D., Blakqori, G., Wagner, V., *et al.* (2004). Inhibition of RNA polymerase II phosphorylation by a viral interferon antagonist. *J Biol Chem* **279**(30), 31471-31477.
- Tiley, L. S., Hagen, M., Matthews, J. T., *et al.* (1994). Sequence-specific binding of the influenza virus RNA polymerase to sequences located at the 5' ends of the viral RNAs. *J Virol* **68**(8), 5108-5116.
- Torreira, E., Schoehn, G., Fernandez, Y., *et al.* (2007). Three-dimensional model for the isolated recombinant influenza virus polymerase heterotrimer. *Nucleic Acids Res* **35**(11), 3774-3783.
- Toyoda, T., Adyshev, D. M., Kobayashi, M., *et al.* (1996). Molecular assembly of the influenza virus RNA polymerase: determination of the subunit-subunit contact sites. *J Gen Virol* **77** ( Pt 9), 2149-2157.
- Toyoda, T., Hara, K., and Imamura, Y. (2003). Ser624 of the PA subunit of influenza A virus is not essential for viral growth in cells and mice, but required for the maximal viral growth. *Arch Virol* **148**(9), 1687-1696.
- Tumpey, T. M., Basler, C. F., Aguilar, P. V., *et al.* (2005). Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science* **310**(5745), 77-80.
- Turan, K., Mibayashi, M., Sugiyama, K., *et al.* (2004). Nuclear MxA proteins form a complex with influenza virus NP and inhibit the transcription of the engineered influenza virus genome.

- Nucleic Acids Res* **32**(2), 643-652.
- Ulmanen, I., Broni, B., and Krug, R. M. (1983). Influenza virus temperature-sensitive cap (m7GpppNm)-dependent endonuclease. *J Virol* **45**(1), 27-35.
- Ulmanen, I., Broni, B. A., and Krug, R. M. (1981). Role of two of the influenza virus core P proteins in recognizing cap 1 structures (m7GpppNm) on RNAs and in initiating viral RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(12), 7355-7359.
- Valcárcel, J., Portela, A., and Ortin, J. (1991). Regulated M1 mRNA splicing in influenza virus-infected cells. *J Gen Virol* **72** ( Pt 6), 1301-1308.
- Varghese, J. N., Laver, W. G., and Colman, P. M. (1983). Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature* **303**(5912), 35-40.
- Villacé, P., Marion, R. M., and Ortin, J. (2004). The composition of Staufen-containing RNA granules from human cells indicates their role in the regulated transport and translation of messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* **32**(8), 2411-2420.
- Vogt, C., Preuss, E., Mayer, D., *et al.* (2008). The interferon antagonist ML protein of thogoto virus targets general transcription factor IIB. *J Virol* **82**(22), 11446-11453.
- Wang, P., Palese, P., and O'Neill, R. E. (1997). The NPI-1/NPI-3 (karyopherin alpha) binding site on the influenza A virus nucleoprotein NP is a nonconventional nuclear localization signal. *J Virol* **71**(3), 1850-1856.
- Wang, W., Cui, Z. Q., Han, H., *et al.* (2008). Imaging and characterizing influenza A virus mRNA transport in living cells. *Nucleic Acids Res* **36**(15), 4913-4928.
- Watanabe, K., Fuse, T., Asano, I., *et al.* (2006). Identification of Hsc70 as an influenza virus matrix protein (M1) binding factor involved in the virus life cycle. *FEBS Lett* **580**(24), 5785-5790.
- Watanabe, M., Yanagisawa, J., Kitagawa, H., *et al.* (2001). A subfamily of RNA-binding DEAD-box proteins acts as an estrogen receptor alpha coactivator through the N-terminal activation domain (AF-1) with an RNA coactivator, SRA. *Embo J* **20**(6), 1341-1352.
- Watanabe, T., Watanabe, S., Noda, T., *et al.* (2003). Exploitation of nucleic acid packaging signals to generate a novel influenza virus-based vector stably expressing two foreign genes. *J Virol* **77**(19), 10575-10583.
- Watanabe, T., Watanabe, S., Shinya, K., *et al.* (2009). Viral RNA polymerase complex promotes optimal growth of 1918 virus in the lower respiratory tract of ferrets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(2), 588-592.
- Weber, F., Haller, O., and Kochs, G. (2000). MxA GTPase blocks reporter gene expression of reconstituted Thogoto virus ribonucleoprotein complexes. *J Virol* **74**(1), 560-563.
- Webster, R. G., Bean, W. J., Gorman, O. T., *et al.* (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* **56**(1), 152-179.
- Webster, R. G., Geraci, J., Petursson, G., *et al.* (1981). Conjunctivitis in human beings caused by influenza A virus of seals. *N Engl J Med* **304**(15), 911.
- Wei, P., Garber, M. E., Fang, S. M., *et al.* (1998). A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-

- specific binding to TAR RNA. *Cell* **92**(4), 451-462.
- Weis, W., Brown, J. H., Cusack, S., *et al.* (1988). Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature* **333**(6172), 426-431.
- Wen, Y., and Shatkin, A. J. (1999). Transcription elongation factor hSPT5 stimulates mRNA capping. *Genes Dev* **13**(14), 1774-1779.
- World Health Organization. Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A(H5N1) Reported to WHO. WHO. 22 May 2009. [http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/country/cases\\_table\\_2009\\_05\\_22/en/index.html](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2009_05_22/en/index.html).
- WHO (1979). A revised system of nomenclature for influenza A viruses. *Bull World Health Organ* **57**(4), 611-617.
- Wigler, M., Pellicer, A., Silverstein, S., *et al.* (1979). DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(3), 1373-1376.
- Wolff, T., O'Neill, R. E., and Palese, P. (1996). Interaction cloning of NS1-I, a human protein that binds to the nonstructural NS1 proteins of influenza A and B viruses. *J Virol* **70**(8), 5363-5372.
- Wolff, T., O'Neill, R. E., and Palese, P. (1998). NS1-Binding protein (NS1-BP): a novel human protein that interacts with the influenza A virus nonstructural NS1 protein is relocalized in the nuclei of infected cells. *J Virol* **72**(9), 7170-7180.
- Wright, P. F., and Webster, R.G. (2001). Orthomyxoviruses. In "Virology 4th Edition" (Fields, B. N., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B, Straus, S.E., Knipe, D.M., Ed.), Vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins Publishers.
- Yamada, S., Suzuki, Y., Suzuki, T., *et al.* (2006a). Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature* **444**(7117), 378-382.
- Yamada, T., Yamaguchi, Y., Inukai, N., *et al.* (2006b). P-TEFb-mediated phosphorylation of hSpt5 C-terminal repeats is critical for processive transcription elongation. *Mol Cell* **21**(2), 227-237.
- Yamanaka, K., Ishihama, A., and Nagata, K. (1990). Reconstitution of influenza virus RNA-nucleoprotein complexes structurally resembling native viral ribonucleoprotein cores. *J Biol Chem* **265**(19), 11151-11155.
- Yamanaka, K., Nagata, K., and Ishihama, A. (1991). Temporal control for translation of influenza virus mRNAs. *Arch Virol* **120**(1-2), 33-42.
- Yasuda, J., Nakada, S., Kato, A., *et al.* (1993). Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix. *Virology* **196**(1), 249-255.
- Ye, Z. P., Baylor, N. W., and Wagner, R. R. (1989). Transcription-inhibition and RNA-binding domains of influenza A virus matrix protein mapped with anti-idiotypic antibodies and synthetic peptides. *J Virol* **63**(9), 3586-3594.
- Ye, Z. P., Pal, R., Fox, J. W., *et al.* (1987). Functional and antigenic domains of the matrix (M1) protein of influenza A virus. *J Virol* **61**(2), 239-246.
- Yedavalli, V. S., Neuveut, C., Chi, Y. H., *et al.* (2004). Requirement of DDX3 DEAD

- box RNA helicase for HIV-1 Rev-RRE export function. *Cell* **119**(3), 381-392.
- Yeo, M., Lin, P. S., Dahmus, M. E., *et al.* (2003). A novel RNA polymerase II C-terminal domain phosphatase that preferentially dephosphorylates serine 5. *J Biol Chem* **278**(28), 26078-26085.
- Young, R. J., and Content, J. (1971). 5'-terminus of influenza virus RNA. *Nat New Biol* **230**(13), 140-142.
- Yuan, P., Bartlam, M., Lou, Z., *et al.* (2009). Crystal structure of an avian influenza polymerase PA(N) reveals an endonuclease active site. *Nature* **458**(7240), 909-913.
- Yuryev, A., Patturajan, M., Litingtung, Y., *et al.* (1996). The C-terminal domain of the largest subunit of RNA polymerase II interacts with a novel set of serine/arginine-rich proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(14), 6975-6980.
- Zamarin, D., Garcia-Sastre, A., Xiao, X., *et al.* (2005). Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLoS Pathog* **1**(1), e4.
- Zamarin, D., Ortigoza, M. B., and Palese, P. (2006). Influenza A virus PB1-F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice. *J Virol* **80**(16), 7976-7983.
- Zebedee, S. L., and Lamb, R. A. (1988). Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *J Virol* **62**(8), 2762-2772.
- Zhao, J., Hyman, L., and Moore, C. (1999). Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**(2), 405-445.
- Zhirnov, O. P., and Klenk, H. D. (1997). Histones as a target for influenza virus matrix protein M1. *Virology* **235**(2), 302-310.
- Zhou, C., and Knipe, D. M. (2002). Association of herpes simplex virus type 1 ICP8 and ICP27 proteins with cellular RNA polymerase II holoenzyme. *J Virol* **76**(12), 5893-5904.
- Zhou, M., Halanski, M. A., Radonovich, M. F., *et al.* (2000). Tat modifies the activity of CDK9 to phosphorylate serine 5 of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain during human immunodeficiency virus type 1 transcription. *Mol Cell Biol* **20**(14), 5077-5086.
- Zurcher, T., de la Luna, S., Sanz-Ezquerro, J. J., *et al.* (1996). Mutational analysis of the influenza virus A/Victoria/3/75 PA protein: studies of interaction with PB1 protein and identification of a dominant negative mutant. *J Gen Virol* **77** ( Pt 8), 1745-1749.
- Zurcher, T., Marion, R. M., and Ortin, J. (2000). Protein synthesis shut-off induced by influenza virus infection is independent of PKR activity. *J Virol* **74**(18), 8781-8784.
- Zurcher, T., Pavlovic, J., and Staeheli, P. (1992). Mechanism of human MxA protein action: variants with changed antiviral properties. *Embo J* **11**(4), 1657-1661.
- Zvonarjev, A. Y., and Ghendon, Y. Z. (1980). Influence of membrane (M) protein on influenza A virus virion transcriptase activity in vitro and its susceptibility to rimantadine. *J Virol* **33**(2), 583-586.

















# hCLE/CGI-99, a Human Protein that Interacts with the Influenza Virus Polymerase, Is a mRNA Transcription Modulator

Alicia Pérez-González, Ariel Rodríguez, Maite Huarte  
Iñigo J. Salanueva and Amelia Nieto\*

Centro Nacional de  
Biotecnología, Cantoblanco  
28049 Madrid, Spain

The human protein hCLE was previously identified by its interaction with the PA subunit of influenza virus polymerase. It exhibits a sequence similarity of 38% with the yeast Spt16 component of the FACT complex, which is involved in transcriptional regulation. Therefore, we studied the possible relationship of hCLE with the transcription machinery. Here we show that hCLE and different phosphorylated forms of the RNA polymerase II (RNAP II) largest subunit, co-immunoprecipitate and colocalize by confocal microscopy analysis. Furthermore, hCLE was found in nuclear sites of active mRNA synthesis, as demonstrated by its colocalization with spots of *in situ* Br-UTP incorporation. Silencing of hCLE expression by RNA interference inhibited the synthesis of RNAP II transcripts around 50%. Accordingly, the expression profiling in hCLE-silenced cells studied by microarray analysis showed that, among the genes that exhibited a differential expression under hCLE silencing, more than 90% were down-regulated. Collectively these results indicate that hCLE works as a positive modulator of the RNA polymerase II activity.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** hCLE/CGI-99; transcription; RNAP II; influenza virus; CTD-phosphorylation

\*Corresponding author

## Introduction

Cellular RNA metabolism is accomplished by a wide network of multiprotein complexes that couple RNA transcription, processing, transport and translation leading to an accurate pattern of protein expression necessary for a proper cellular development. Many RNA viruses interfere with this network and take over the cellular gene expression and translation machinery for their own benefit. Looking for cellular factors that could be necessary for gene expression of influenza virus we isolated a protein,

hCLE/CGI-99, that interacts with the PA subunit of the viral polymerase.<sup>1</sup> This host factor is a 32 kDa protein of nuclear and cytoplasmic distribution that is expressed ubiquitously and associates to active, purified viral ribonucleoproteins (RNPs) reconstituted *in vivo*.<sup>1</sup> The viral RNA polymerase is composed of three subunits, PB1, PB2 and PA that are part of the viral RNPs<sup>2–4</sup> and carry out viral transcription and replication in the nucleus of the infected cell.<sup>5</sup> The transcription process involves a cap-stealing mechanism by which 5'-capped oligonucleotides derived from newly synthesized RNA polymerase (RNAP) II transcripts are used as primers and elongated by the viral polymerase.<sup>6,7</sup> In line with this transcription strategy, parental virion RNPs colocalize with active RNAP II in the infected cell nucleus (unpublished results) and *in vivo* reconstituted viral polymerase co-immunoprecipitates with the RNAP II.<sup>8</sup>

Databases searches have shown that hCLE has a sequence similarity of 38% to the central region of the yeast protein Cdc68 (also named ySpt16). Yeast Spt16 is an essential nuclear protein that associates with Pab3 to form the CP or yFACT complex.<sup>9</sup>

Present addresses: M. Huarte, Harvard Medical School, Pathology Department, New Research Building, Room 854, 77 Ave Louis Pasteur, Boston 02115 MA, USA; I. Salanueva, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid.

Abbreviations used: RNAP, RNA polymerase; RNP, ribonucleoprotein; CTD, C-terminal domain; HPRI, human placental ribonuclease inhibitor.

E-mail address of the corresponding author:  
[anmartin@cnb.uam.es](mailto:anmartin@cnb.uam.es)

Analogues to this complex are found in different species, such as DUF from *Xenopus laevis*,<sup>10</sup> DRE from *Drosophila melanogaster*,<sup>11</sup> hFACT from human<sup>12</sup> or the corresponding complex from *Arabidopsis thaliana*.<sup>13</sup> The FACT complexes are components of transcriptional regulator complexes and biochemical and genetic studies of transcription have identified them as chromatin-specific factors required for transcription elongation.<sup>14,15</sup> Yeast Spt16 was shown to copurify with factors engaged in the elongation phase of the transcription process<sup>15,16</sup> and hFACT seems to function *in vivo* as a factor required for transcription elongation.<sup>17–19</sup>

Recently hCLE/CGI-99 has been found in dendrites in kinesin-associated granules that play a role in local protein synthesis.<sup>20</sup> During the characterization of kinesin-containing RNA-transporting granules in neurons, 42 associated proteins were found, among them Staufen-1 and the hCLE/CGI-99 proteins.<sup>20</sup> Staufen-1 is involved in mRNA localization and translation and has been found associated to the NS1 protein of influenza virus in HEK293 cells.<sup>21,22</sup> Co-immunoprecipitation studies indicated the association of hCLE/CGI-99 with the translation elongation factor EF-1 $\alpha$  and DDX1 proteins in the kinesin granules.<sup>20</sup> DDX1 protein is an RNA and DNA binding protein that binds poly(A), has helicase and ATPase activities<sup>23,24</sup> and has been implicated in the 3' end processing of pre-mRNA.<sup>25</sup>

Taking these observations into account, we studied the possibility that hCLE could have a function on cellular transcription and might represent a link between the sites of capped RNA synthesis and the viral polymerase. Here we show that hCLE is physically and functionally associated to RNAP II. The silencing of the hCLE gene caused a remarkable decrease of cellular RNAP II-directed transcription. Moreover, transcription profiling upon hCLE silencing showed that among the genes that are regulated by hCLE, the majority were down-regulated, suggesting that hCLE is a modulator of the RNAP II activity.

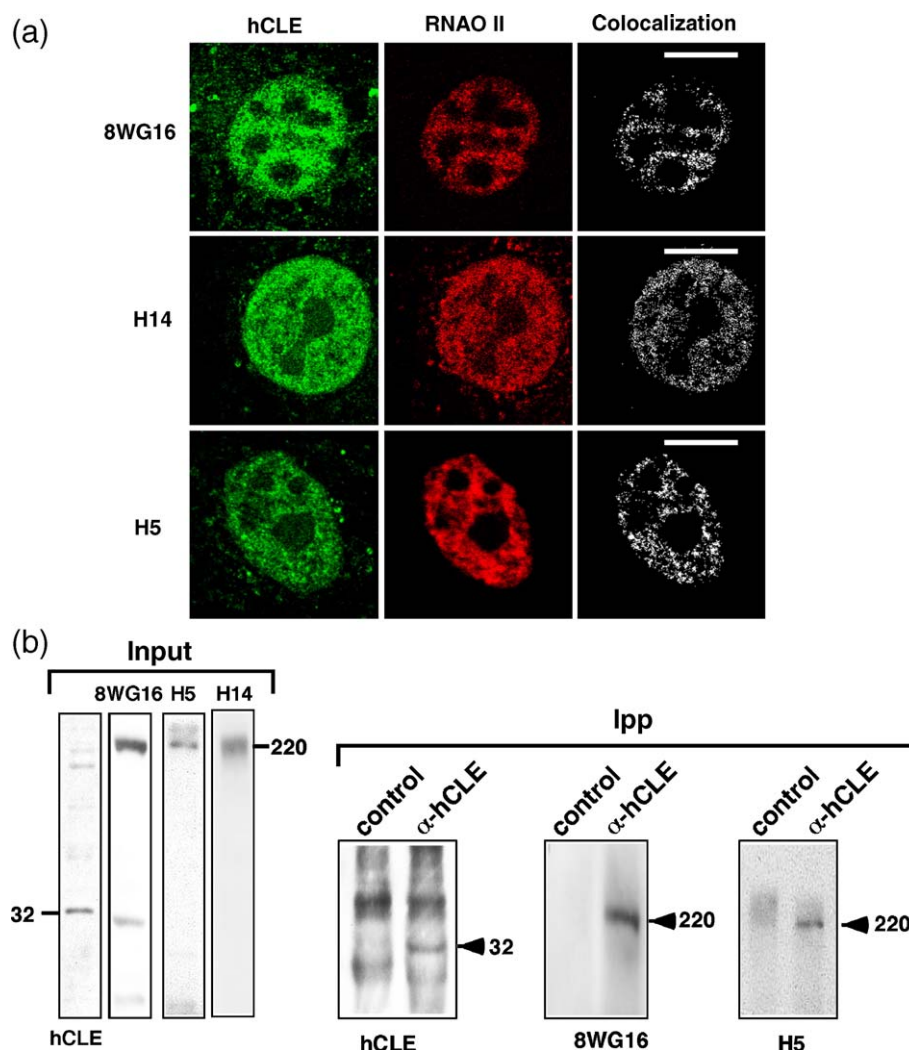
## Results

### hCLE/CGI-99 is associated to RNA polymerase II and is present in nuclear sites of active mRNA synthesis

Since hCLE protein shows similarity to the yeast Spt16 factor, a component of the FACT complex, we studied the possible association of hCLE protein with the cellular mRNA synthesizing apparatus. To investigate this hypothesis, we used confocal immunofluorescence microscopy in MDCK cells to simultaneously study the localization of hCLE and RNAP II. To this aim, specific antibodies for hCLE and antibodies that recognize different phosphorylated forms of the RNAP II largest subunit, such as unphosphorylated at serine 2 (8WG16) and phosphorylated at serine 5 (H14) or at serine 2 (H5) of its

carboxy-terminal domain (CTD), were used.<sup>26</sup> A good colocalization between hCLE and the different RNAP II forms detected with the corresponding antibodies was observed, as can be seen in the colocalization panels (Figure 1(a)). These colocalization data have been obtained using the colocalization mask, that eliminates signals that are not common to both antibodies. To further characterize the hCLE-RNAP II association, co-immunoprecipitation assays were carried out using nuclear extracts from HEK293T cells. The data are presented in Figure 1(b). The presence of hCLE and the different RNAP II forms was verified by Western blot with the corresponding antibodies. The hCLE protein could be immunoprecipitated from the nuclear extracts with the specific antibody but not with an unrelated antibody. As can be seen, the hypo- and hyperphosphorylated RNAP II at serine 2 (RNAP II Ser2-P) were co-immunoprecipitated with the anti-hCLE antibodies, but not with the control antibody. These results indicate that both the hypophosphorylated and the RNAP II Ser2-P are physically associated to the hCLE protein. We also wanted to test the association between hCLE and the RNAP II phosphorylated at serine 5 (RNAP II Ser5-P). Although this form is very clearly visible in total extracts of HEK293T cells, it was undetectable in nuclear extracts. It is possible that phosphorylation at serine 5 was more transient or unstable than that of serine 2 of the CTD, impeding its examination under these conditions.

To ascertain whether the sites of hCLE-RNAP II colocalization represent active transcription sites, live MDCK cells were permeabilized and *in situ* incorporation of Br-UTP was carried out as described in Materials and Methods. These cells were chosen as they attach very firmly to the incubation plates facilitating *in situ* studies. After RNA synthesis, the cells were fixed and stained with anti-Br-dUridine and anti-hCLE antibodies to monitor nuclear sites of RNA synthesis and localization of endogenous hCLE. The label obtained was true RNA synthesis, as it was dependent on the presence of all four nucleoside triphosphates (data not shown). The results are presented in Figure 2(a). RNA synthesis showed a punctuated pattern and hCLE was clearly present in an important fraction of the RNA synthesis-dots as can be observed in the merge and colocalization panels. The same experiment was performed in the presence of 100  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -amanitin to inhibit both RNAP II and III. As expected, only nucleolar staining due to RNA polymerase I was resistant to this treatment and hCLE did not colocalize with nucleolar RNA synthesis. Additional experiments were carried out using  $\alpha$ -amanitin at 5  $\mu$ g/ml to inhibit RNA polymerase II. Under these conditions, the non-nucleolar RNA synthesis due to RNA polymerase III was very scarce and did not allow a precise examination of colocalization with hCLE (data not shown). This fact indicates that the non-nucleolar RNA synthesis detected in the absence of  $\alpha$ -amanitin is mainly due to RNAP II activity. Altogether, these results suggest that hCLE is



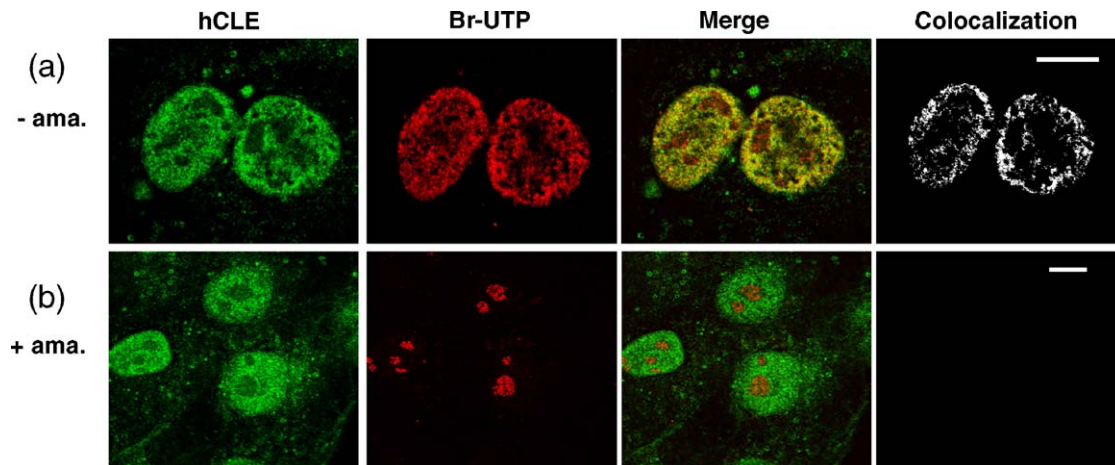
**Figure 1.** hCLE associates to RNA polymerase II complexes. (a) MDCK cells were fixed, processed for immunofluorescence and analyzed by confocal microscopy. Confocal sections were acquired sequentially every 0.2–0.3  $\mu\text{m}$ . An anti-hCLE antibody was used to detect hCLE protein (hCLE) and antibodies 8WG16 (top), H14 (middle), or H5 (bottom) for RNA polymerase II (RNAP II), respectively. Colocalization panel shows signals common to both antibodies obtained with the colocalization mask. (b) HEK293T nuclear extracts were used for co-immunoprecipitation assays to study the hCLE-RNA polymerase II association. The presence of hCLE and RNA polymerase II was monitored by Western blot with the  $\alpha$ -hCLE or  $\alpha$ -RNAP II (8WG16), (H5) and (H14) antibodies, respectively. (Input), represent the HEK293T nuclear extracts and (Ipp) the immunoprecipitates using anti-hCLE ( $\alpha$ -hCLE) or a control antibody (control). The percentages of RNAP II co-immunoprecipitated with hCLE are 5.7% and 6.5% of the input, using antibodies 8WG16 or H5 for Western blot detection, respectively. Bars represent 10  $\mu\text{m}$ .

physically associated to intranuclear sites of RNAP II transcription and propose a role for hCLE in this process.

Next we examined if hCLE association to RNAP II was dependent on active transcription. To answer this question we used confocal microscopy in MDCK cells treated during 1 h with  $\alpha$ -amanitin at 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , to simultaneously study the pattern of nuclear distribution of the different RNAP II forms and hCLE, in conditions of transcription inhibition. Incorporation of Br-UTP was carried out as a control of the effectiveness of the treatment and the results are presented in Figure 3(a). Treatment with  $\alpha$ -amanitin clearly inhibited the transcriptional activity of the RNAP II as observed in the Br-UTP panels, where exclusively nucleolar-RNA synthesis was

detected. According to the previous results (Figure 2), hCLE distribution did not show variations after the drug treatment. The distribution of the hypophosphorylated RNAP II and the RNAP II Ser2-P did not change upon 1 h of  $\alpha$ -amanitin treatment, whereas the RNAP II Ser5-P, which is involved in transcription initiation,<sup>27</sup> showed a partial disruption with the drug treatment. On the other hand, 1 h treatment with  $\alpha$ -amanitin did not change the accumulation levels of the different RNAP II forms, as detected with Western blot assays using antibodies against this protein (Figure 3(b)). Although changes in the nuclear distribution of RNAP II Ser2-P have been reported with  $\alpha$ -amanitin treatment in HeLa cells,<sup>28,29</sup> no major changes were observed for total RNAP II in this situation. The





**Figure 2.** hCLE is present in sites of RNA synthesis. (a) Permeabilized MDCK cells were used to detect RNA synthesis by Br-UTP incorporation. After a RNA synthesis pulse of 1 h, cells were fixed, processed for immunofluorescence and analyzed using confocal microscopy. Confocal sections were acquired sequentially every 0.2–0.3  $\mu\text{m}$ . hCLE detection (hCLE) was achieved with anti-hCLE antibody and RNA synthesis (Br-UTP) with anti-BrdUridine antibody. Colocalization panel shows signals common to both antibodies obtained with the colocalization mask. (b) The same experiment was done in the presence of 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of  $\alpha$ -amanitin to inhibit the RNAP II RNA synthesis. Bars represent 10  $\mu\text{m}$ .

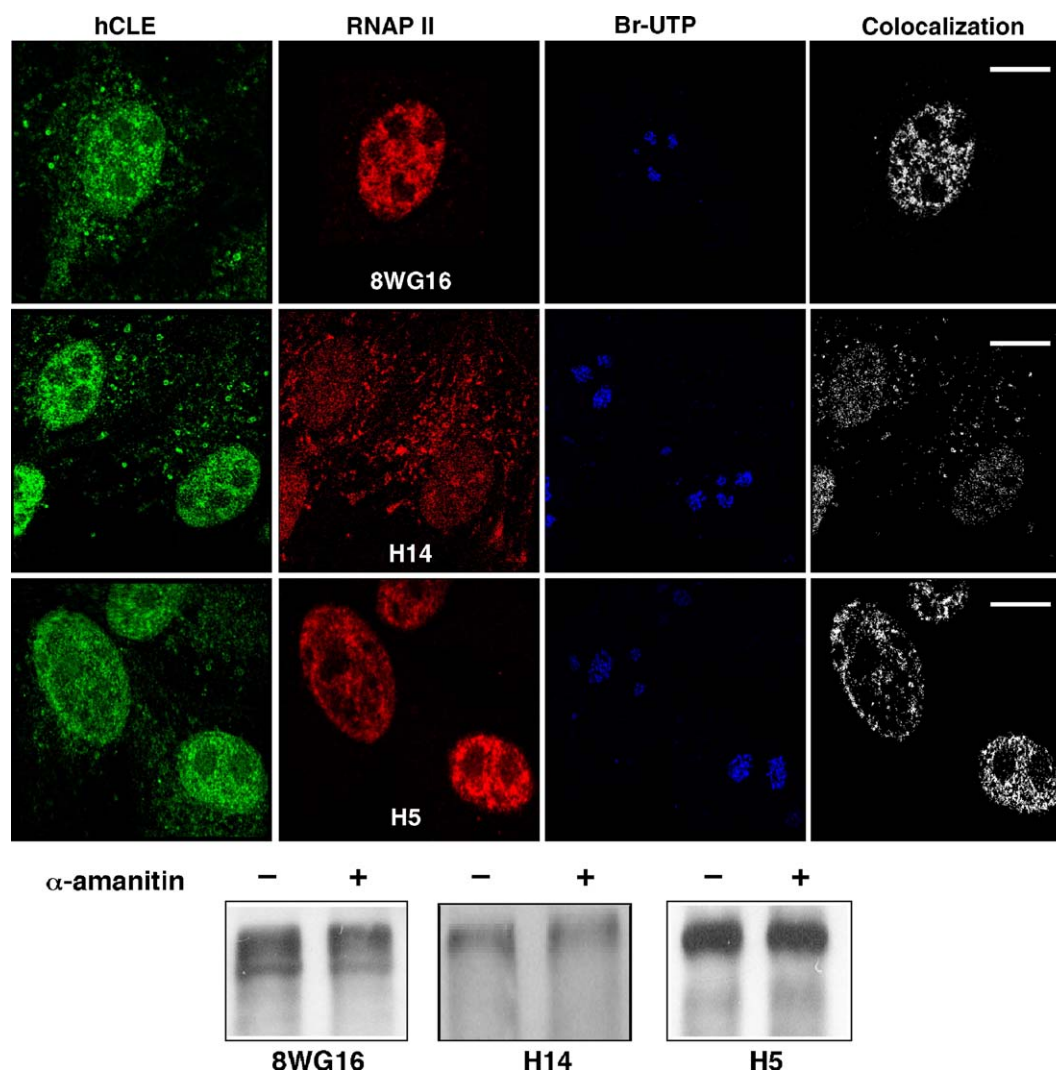
transcriptional process is arrested at the initiation step by high concentrations of  $\alpha$ -amanitin,<sup>30</sup> which is in agreement with the observed disturbance in the nuclear localization of the RNAP II Ser5-P in the treated cells. Alternatively, changes in the protein composition of the transcription initiation complex can occur upon  $\alpha$ -amanitin treatment resulting in a restricted reactivity of the H14 antibody in these conditions. As can be observed, the level of colocalization between hCLE and the RNAP II Ser5-P seems to decrease under conditions of inhibition of mRNA synthesis, although the nuclear disturbance and decreased accumulation of RNAP II Ser5-P, do not allow an unambiguous conclusion. On the other hand, under conditions where RNAP II-dependent transcription was inhibited, the hCLE protein remained associated to the hypophosphorylated RNAP II or RNAP II Ser2-P. Although it is plausible that hCLE-RNAP II association occurs only in the context of active transcription but once formed the complex is very stable, the presented data support the statement of a transcription-independent hCLE-RNAP II association.

#### hCLE/CGI-99 modulates the RNA polymerase II activity

To explore the possible role of endogenous hCLE on mRNA synthesis we performed gene-silencing experiments using RNA interference. To study the phenotype of hCLE loss-of-function, we generated a construct of plasmid pSUPER<sup>31</sup> expressing under the RNAP III H1 promoter a small hairpin transcript containing a 23 nt sequence derived from the hCLE mRNA (pSUPER-hCLE). As negative control we used a construct of pSUPER expressing a 21 nt RNA derived from the transcript of the Dgk $\alpha$  gene (pSUPER-Dgk $\alpha$ ).<sup>32</sup> This gene is not expressed in the cell line used, HEK293T.<sup>32</sup> To analyze the effec-

tiveness of the construct to down-regulate the hCLE gene, HEK293T cells were transfected with plasmid pSUPER-hCLE, or pSUPER-Dgk $\alpha$  and 48 h post-transfection, nuclei were isolated as described in Materials and Methods and Western blot assays were carried out using an anti-hCLE antibody. As negative control the same membrane was used to perform Western blot analysis, using antibodies against  $\beta$ -tubulin. As can be seen in Figure 4(a), the amount of hCLE protein was severely decreased in pSUPER hCLE transfected cells (30% of hCLE protein remains after treatment), indicating that this treatment efficiently down-regulates the hCLE gene. We also assayed the effect of pSUPER hCLE transfection in the endogenous levels of hCLE transcript in the same conditions. Then, total RNA was isolated and expression of hCLE gene was determined by Northern blot assays as described in Materials and Methods. Two different species of hCLE RNA whose accumulation decreases in pSUPER-hCLE transfected cells were detected (Figure 4(b)).

Subsequently we assayed the effect of hCLE silencing on mRNA synthesis. Cultures of HEK293T cells were transfected with pSUPER-Dgk $\alpha$  or pSUPER-hCLE plasmids and at 48 h post-transfection nuclei of these cells were isolated and frozen. These nuclei were afterwards used to perform *in vitro* RNA synthesis with or without  $\alpha$ -amanitin (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) to evaluate the RNAP II-directed RNA synthesis as described in Materials and Methods. In parallel the transfected HEK293T cells were used to determine the endogenous hCLE levels, to assure the effectiveness of the hCLE silencing. Five different experiments were carried out with triplicate independent samples and the results obtained are shown in Figure 4(c), as average values and standard deviations. The RNA synthesis due to RNA polymerase II activity is calculated as the difference between the values obtained without the drug (total synthesis



**Figure 3.** hCLE-RNAP II association is transcription-independent. Permeabilized MDCK cells treated with 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$   $\alpha$ -amanitin during 1 h were used to detect hCLE-RNAP II association and RNA synthesis by Br-UTP incorporation. The cells were fixed, processed for immunofluorescence and analyzed using confocal microscopy. Confocal sections were acquired sequentially every 0.2–0.3  $\mu\text{m}$ . hCLE and RNAP II phosphorylated forms were detected with anti-hCLE antibody (hCLE) and 8WG16, H14 and H5 antibodies (RNAP II) respectively, as described in Materials and Methods. Br-UTP panels show RNA synthesis. Colocalization panels show signals common to hCLE and RNAP II antibodies obtained with the colocalization mask. Bottom; Western blots against RNAP II using 8WG16, H14 and H5 antibodies of cells untreated (–) or treated (+) with  $\alpha$ -amanitin during 1 h. Bars represent 10  $\mu\text{m}$ .

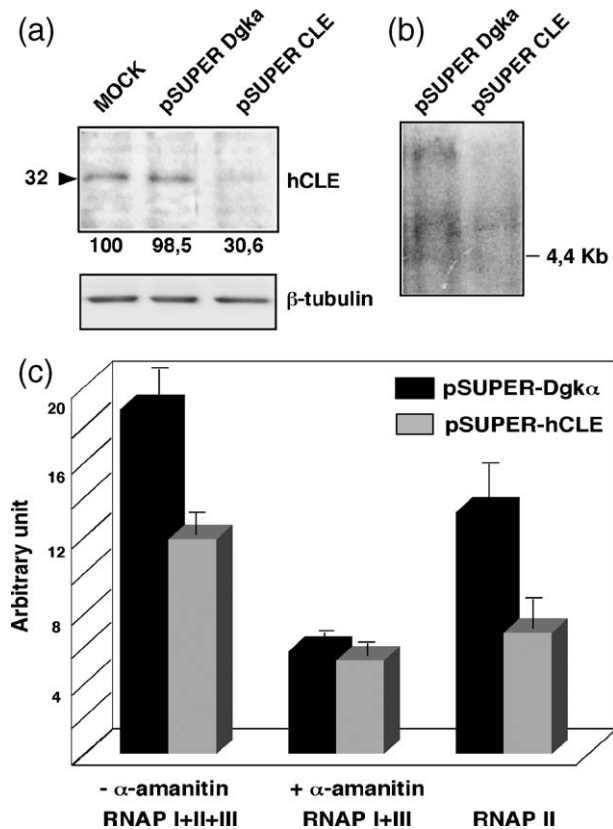
RNAP I+II+III) and with the drug (RNAP I+III). As can be observed, silencing of hCLE produced a decrease in RNAP II-directed RNA synthesis of around 50%, whereas synthesis directed by RNA polymerase I plus III was not affected. Similar experiments were carried out in *in situ* analysis and an analogous reduction in mRNA synthesis was also obtained in these conditions (data not shown). These results indicate that hCLE is required for an appropriate RNAP II transcriptional activity.

#### Effect of hCLE/CGI-99 silencing on global gene expression

The observed inhibition of mRNA synthesis when hCLE is down-regulated could be the consequence of an important inhibition of some very actively

transcribed genes or the moderate inhibition of a large number of genes. To distinguish between these possibilities, we examined the global gene expression under hCLE silencing conditions by using a microarray screening. RNA from pSUPER-Dgk $\alpha$  or pSUPER-hCLE transfected HEK293T cells was isolated at 48 h post-transfection and used to hybridize the Human oligo set from Qiagen-Operon chips containing 22,264 known human genes, as described in Materials and Methods. The “fold change” parameter of the microarray analysis software was used as value to choose statistically significant changes in gene expression. Genes with absolute values of 1.5-fold change or greater were considered as differentially expressed. Fold change values greater than 0 (positives) mean up-regulation, whereas values lower than 0 (negatives) represent





**Figure 4.** Silencing of hCLE gene decreases the RNAP II-dependent RNA synthesis in isolated nuclei. (a) HEK293T cells were mock-transfected (MOCK) or transfected with pSUPER Dgkα or pSUPER hCLE. 48 h post-transfection cell nuclei were isolated and used for Western blot analysis with antibodies against hCLE (1:1000) and β-tubulin (1:15,000) that was used as control. (b) Total RNA was isolated from the same cells as in (a), separated in denaturing gels, transferred to nylon membranes and probed with a radiolabeled specific riboprobe for hCLE gene. (c) The same cell nuclei as in (a) were used to analyze the RNA synthesis by *in vitro* incorporation of a labeled nucleotide. The synthesis was performed with or without α-amanitin (5 μg/ml), to detect the RNA synthesis directed by the RNAP I plus RNAP III or the total RNA synthesis (RNAP I+II+III) respectively, as described in Materials and Methods.

down-regulation. This parameter is non-linear, so genes with slight fold change values can present very different mRNA expression. Microarray analysis identified 290 genes that exhibited a differential expression under hCLE silencing. Among these, 266 (91.7%) genes were down-regulated and only 24 (8.3%) were up-regulated in hCLE-silenced cells. To assess the potential functionality of these genes, the gene products were grouped into Gene Ontology categories with the assistance of *fatigo* data base.<sup>33</sup> Of the 290 hCLE-responsive genes, 125 had known biological roles and are listed in Table 1. The functions of these genes include many different categories and among these functional groups, genes corresponding to transcription factors and cell signaling were the most represented categories (around 11% each one). A representation

of the global change in the different functional groups is shown in Figure 5. The microarray analysis revealed that up to 10% (2322) of the total genes represented in the chip were down-regulated under hCLE-silenced conditions by onefold change (data not shown). These data, together with those presented in Figures 4 and 5 show that the silencing of hCLE gene essentially originated a down-regulation of gene expression and indicate that hCLE affects the expression of a considerable number of genes.

In order to verify the data generated from the microarray, we analyzed by semiquantitative RT-PCR the expression of a number of genes identified as regulated by hCLE silencing. The *TGFBR1* (transforming growth factor, beta receptor I) gene that is down-regulated and *DYNLRB1* (Dynein light chain 2A), *HYPK* (Huntingtin interacting protein K) and *DFFA* (DNA fragmentation factor) genes that are up-regulated in hCLE knock-down cells were used. *GAPDH* served as a control gene whose expression is not altered under these conditions. The data are presented in Figure 6. A unique amplification PCR product of the expected size was obtained for every gene (Figure 6(a)). Consistent with the microarray data, hCLE-silencing either inhibited or stimulated the mRNA level of the corresponding genes, validating the obtained results (Figure 6(b)). A quantification of the expression levels of these genes under hCLE silencing, normalized by the expression levels of *GAPDH* gene is presented in Figure 6(c).

Although the fold change values obtained in the microarray analysis fluctuate in the range of 2.34 to 1.5, it should be mentioned that even the hCLE gene was downregulated by a -1.34-fold change upon hCLE-silencing and both its mRNA and protein accumulation (Figure 4) levels were severely reduced in these conditions. Then, these data together with the RT-PCR analysis provide the required reliability to allow a correct interpretation of the effects of hCLE knock-down in the expression profile of cellular mRNAs.

## Discussion

The mammalian RNAP II CTD consists of more than 50 repeats of the YSPTSPS heptapeptide,<sup>34</sup> being the main phosphoacceptor residues, the Ser2 and Ser5 (see Palancade and Pencaude<sup>26</sup> for a review). It has been reported that serine 5 phosphorylation is detected at the promoter region of the transcribing genes, whereas serine 2 phosphorylation is required for transcription elongation. The sequence homology between hCLE/CGI-99 and the FACT family of transcription activators suggested that hCLE could be a transcription-related protein. Here we provide data that support this statement. (i) hCLE colocalizes with the different RNAP II forms and co-immunoprecipitates at least with both the hypophosphorylated RNAP II and the RNAP II Ser2-P, (ii) hCLE is present in intranuclear sites of RNAP II-directed RNA transcription and (iii) hCLE

**Table 1.** Expression profiling in hCLE-silenced cells

	Gene name	GenBank accession	Fold change <sup>a</sup>
<i>Transcription factors</i>			
FOXO1A	Forkhead box O1A	NM_002015	-2.00
KIAA1474	KIAA1474 protein	AL136805	-1.99
PLAGL1	Pleiomorphic adenoma gene-like 1	U72621	-1.82
RBM15	RNA binding motif protein 15	NM_022768	-1.75
POU4F2	POU domain, class 4, transcription factor 2	NM_004575	-1.64
RREB1	Ras responsive element binding protein 1	D49835	-1.64
NAB1	NGFI-A binding protein 1 (EGR1 binding protein 1)	AF045451	-1.63
MGC:9010	Homo sapiens, IMAGE:3873712, mRNA, complete cds	BC008688	-1.62
SREBF1	Sterol regulatory element binding transcription factor 1	NM_004176	-1.61
NEUROD1	Neurogenic differentiation 1	NM_002500	-1.60
SIM1	Single-minded homolog 1 (Drosophila)	NM_005068	-1.59
AML1		S76346	-1.58
DKFZp434J0828	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434J0828	AJ420510	-1.58
RAI	RelA-associated inhibitor	NM_006663	-1.57
MGC14797	Hypothetical protein MGC14797	AB058726	-1.56
TRIP8	Thyroid hormone receptor interactor 8	AB037801	-1.53
STAT5A	Signal transducer and activator of transcription 5 <sup>a</sup>	NM_003152	-1.52
TAF9L	RNA polymerase II, TATA box binding protein	BC009566	-1.50
<i>Cell signalling</i>			
LOC57401	Uncharacterized gastric protein ZG24P	AF264628	-2.01
TGFBRI	Transforming growth factor, beta receptor I (activin A receptor type II-like kinase, 53kD)	NM_004612	-1.91
ADAM9	A disintegrin and metalloproteinase domain 9 (meltrin gamma)	NM_003816	-1.66
PTPRK	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, K	NM_002844	-1.64
MAPK6	Mitogen-activated protein kinase 6	NM_002748	-1.60
FY	Duffy blood group	NM_002036	-1.60
NM23-H6	Nucleoside diphosphate kinase type 6 (inhibitor of p53-induced apoptosis-alpha)	NM_005793	-1.59
PKIA	Protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor alpha	NM_006823	-1.58
PRKAR2B	Protein kinase, cAMP-dependent	NM_002736	-1.56
RG55	Regulator of G-protein signalling 5 regulatory, type II, beta	NM_003617	-1.55
FLJ10461	Hypothetical protein FLJ10461	NM_018098	-1.54
GNGT2	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma transducing activity	NM_031498	-1.53
GNG2	Guanine nucleotide binding protein	AK026424	-1.53
PTPRR	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, R	NM_002849	-1.52
DKFZP564D0462	Hypothetical protein DKFZP564D0462	AK027843	-1.51
IMAGE:3888869	Homo sapiens, clone, mRNA, partial cds	BC016839	-1.51
C6orf5	Chromosome 6 open reading frame 5 polypeptide 2 (G protein), gamma 2	AF136407	-1.50
DMPK	Dystrophin myotonia-protein kinase	NM_004409	1.62
CSK	C-src tyrosine kinase	NM_004383	1.51
<i>Protein metabolism</i>			
PPT2	Palmitoyl-protein thioesterase 2	AF020544	-1.95
STRIN	STRIN protein	NM_016271	-1.84
MMP8	Matrix metalloproteinase 8	NM_002424	-1.77
HP43.8KD	HP43.8KD protein	AB067478	-1.73
FLJ25267	Homo sapiens cDNA fis, clone STM05473	AK057996	-1.73
FLJ21343	Hypothetical protein FLJ21343	NM_022781	-1.71
DPEP1	Dipeptidase 1 (renal)	NM_004413	-1.65
TRAF1	TNF receptor-associated factor 1	NM_005658	-1.59
FBXL3A	F-box and leucine-rich repeat protein 3A	NM_012158	-1.56
FLJ13255	Homo sapiens cDNA fis, clone OVARC1000800,	AK023317	-1.54
PTPRR	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, R	NM_002849	-1.52
FLJ23560	Hypothetical protein FLJ23560	NM_024685	-1.52
1810055D05	Homo sapiens, Similar to RIKEN cDNA	BC009702	-1.51
ADAMTS3	A disintegrin-like and with thrombospondin type 1 motif, 3	AB002364	-1.51
<i>Immune response and apoptosis</i>			
PF4	Platelet factor 4	NM_002619	-2.37
IL1A	Interleukin 1. alpha	NM_000575	-1.82
KLRC1	Killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1	NM_002259	-1.69
SEMA7A	Sema domain, immunoglobulin domain (Ig) and GPI membrane anchor, (semaphorin) 7 <sup>a</sup>	NM_003612	-1.69
HLA-DPB1	Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1	NM_002121	-1.66
SEMA3C	Sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C	NM_006379	-1.63

(continued on next page)

Table 1 (continued)

	Gene name	GenBank accession	Fold change <sup>a</sup>
<i>Immune response and apoptosis</i>			
NM23-H6	Nucleoside diphosphate kinase type 6 (inhibitor of p53-induced apoptosis- $\alpha$ )	NM_005793	-1.59
ADORA3	Adenosine A3 receptor	NM_000677	-1.57
BDKRB1	Bradykinin receptor B1	NM_000710	-1.55
TLR10	Toll-like receptor 10	NM_030956	-1.53
TNFRSF10A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a	NM_003844	-1.51
CEACAM1	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion mole 1 (biliary glycoprotein)	X16354	-1.51
DFFA	DNA fragmentation factor, 45 kD,	NM_004401	1.62
<i>Development and differentiation</i>			
DKK3	Dickkopf homolog 3 ( <i>Xenopus laevis</i> )	NM_013253	-2.18
CA10	Carbonic anhydrase X	AF288385	-1.72
KIAA1813	KIAA1813 protein	AB058716	-1.75
GDF9	Growth differentiation factor 9	NM_005260	-1.60
FLJ13057	Hypothetical protein FLJ13057 similar to germ cell-less	NM_022471	-1.57
KERA	Keratocan	NM_007035	-1.56
ROD1	ROD1 regulator of differentiation 1 ( <i>S. pombe</i> )	AK001685	-1.53
CD2AP	CD2-associated protein	NM_012120	1.53
SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich	NM_003118	1.51
<i>Intracellular protein transport</i>			
LOC50999	CGI-100 protein	BC016556	-1.82
KIAA0660	Ras-GTPase activating protein SH3 domain-binding protein 2	AB014560	-1.82
NFKBIL2	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 2	NM_013432	-1.64
G3BP	Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein	BC006997	-1.62
SEC24B	SEC24 related gene family, member B ( <i>S. cerevisiae</i> )	NM_006323	-1.62
SEC24A	SEC24 related gene family, member A ( <i>S. cerevisiae</i> )	AJ131244	-1.61
XPO1	Exportin 1 (CRM1 homolog, yeast)	NM_003400	-1.55
TOMM34	Translocase of outer mitochondrial membrane	NM_006809	1.52
FLJ20695	Hypothetical protein FLJ20695	NM_017929	1.52
<i>Protein biosynthesis</i>			
SIAT8A	Sialyltransferase 8A	NM_003034	-1.67
MRPL49	Mitochondrial ribosomal protein L49	NM_004927	-1.61
PRKRIR	Protein-kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent inhibitor,	AF081567	-1.51
EIF4A2	Eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 2	NM_001967	-1.51
MGC2744	Hypothetical protein MGC2744	NM_025267	1.54
JTV1	JTV1 gene	NM_006303	1.52
RPL36A	Ribosomal protein L36a	NM_021029	1.51
<i>Phosphate metabolism</i>			
UMP-CMPK	UMP-CMP kinase	NM_016308	-1.91
FLJ31077	HSYRA2001574, highly similar to GLUCOSAMINE-6-PHOSPHATE ISOMER	AK055639	-1.68
IMPA1	Inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 1	NM_005536	-1.66
TDPGD	DTDP-D-glucose 4,6-dehydratase	NM_014305	-1.58
DKFZp586G2222	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586G2222	AL080111	-1.56
KIAA0630	KIAA0630 protein	AB014530	-1.52
<i>Ion transport</i>			
CSN2	Casein, beta	NM_001891	-1.73
SLC4A7	Solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member Homo sapiens clone 24411 mRNA sequence	AF047033	-1.68
		AF070606	-1.63
CLIC4	Chloride intracellular channel 4	NM_013943	-1.61
COL10A1	Collagen, type X, alpha 1(Schmid metaphyseal chondrodysplasia)	NM_000493	-1.54
ATP1B2	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, beta 2 polypeptide	NM_001678	-1.51
KCNE1	Potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 1	NM_000219	1.53
<i>Nucleic acid metabolism</i>			
KIAA0111	KIAA0111 gene product	NM_014740	-1.68
G3BP	Ras-GTPase-activating protein	BC006997	-1.62
H4FH	H4 histone family, member H SH3-domain-binding protein	NM_003543	-1.61
RBM7	RNA binding motif protein 7	NM_016090	-1.57
H4FA	H4 histone family, member A	NM_003538	-1.55
H2BFD	H2B histone family, member D	BC011372	-1.53
MGEA6	Meningioma expressed antigen 6	NM_005930	-1.53
RAD21	RAD21 homolog ( <i>S. pombe</i> )	NM_006265	-1.50
MGC2744	Hypothetical protein	NM_025267	1.54

**Table 1** (continued)

	Gene name	GenBank accession	Fold change <sup>a</sup>
<i>Cytoskeleton and adhesion</i>			
CDH2	Cadherin 2, type 1. N-cadherin (neuronal)	NM_001792	-1.61
MRAS	Muscle RAS oncogene homolog	AK056337	-1.56
FLJ25193	Homo sapiens cDNA fis, clone JTH00761	AK057922	-1.54
MIG2	Mitogen inducible 2	Z24725	-1.50
DNLC2A	Dynein light chain 2A	NM_014183	1.75
<i>Others</i>			
FLJ11149	Hypothetical protein FLJ11149	BC007069	-1.95
LY75	Lymphocyte antigen 75	NM_002349	-1.73
LYPLA1	Lysophospholipase I	NM_006330	-1.71
SEC15B	Sec15B protein	AB023136	-1.71
ITGAV	Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)	NM_002210	-1.70
FLJ23282	Hypothetical protein FLJ22382	NM_024816	-1.66
	Coproporphyrinogen oxidase (coproporphyrin, harderroporphyrin)	NM_000097	-1.60
CCNE2	Cyclin E2	NM_057749	-1.59
GCLC	Glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit	NM_001498	-1.54

<sup>a</sup> Fold changes lesser than 0 reflect fold repression and those greater than 0 indicate the reciprocal fold induction.

silencing produces a 50% inhibition of mRNA transcription. This important inhibition on mRNA transcription indicates that hCLE plays a significant role in the generation of cellular messengers and is in agreement with the repeated incapability to obtain a stable cell line with a down-regulated expression of hCLE, suggesting that hCLE could be an essential gene.

The hCLE silencing down-regulates a large number of genes. Among the genes that are regulated, many different functional categories were observed although those involved in transcriptional regulation were the most represented. Within this category, some of them modulate the expression of a broad variety of genes such as the TATA box binding protein (TBP), the RelA-associated inhibitor (RelA) and the signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5). TBP is an essential transcription component whose changes have a profound impact on mRNA expression,<sup>35</sup> RelA binds to the NK-kappaB subunit p65 and modulates its transcriptional activity,<sup>36</sup> and STAT5 regulates the expression of genes that determine important cellular phenotypes such as proliferation, apoptosis and differentiation.<sup>37</sup> Interestingly, there are several genes inside this group that are involved in the control of tumor proliferation and in addition some of the genes included in the cell signaling category modulate very important metabolic cascades. Therefore, regarding the functions of these hCLE-regulated genes, a considerable effect on global gene expression should be expected under hCLE silencing conditions, in agreement with the obtained data.

Genes involved in protein biosynthesis are unique in having similar number of genes down and up-regulated by hCLE silencing (Table 1). Within this category it should be mentioned the presence of hStaufen-1 that is involved in local translation, p38 a key structural component of the mammalian aminoacyl-tRNA synthetase complex<sup>38</sup> and ribosomal protein L36 that were up-regulated, together with the double-stranded RNA-activated kinase (PKR) that was down-regulated. PKR is a protein kinase that

modulates a number of different stress processes and its stimulation gives rise to translation inhibition.<sup>39</sup> Then, appropriate p38 and PKR levels are required for a suitable protein translation and the up-regulation of p38 and Staufen-1 and down-regulation of PKR could lead to translation stimulation. It is possible that the observed variations in their expression could be a response in hCLE-silenced cells to compensate the inhibition of mRNA transcription.

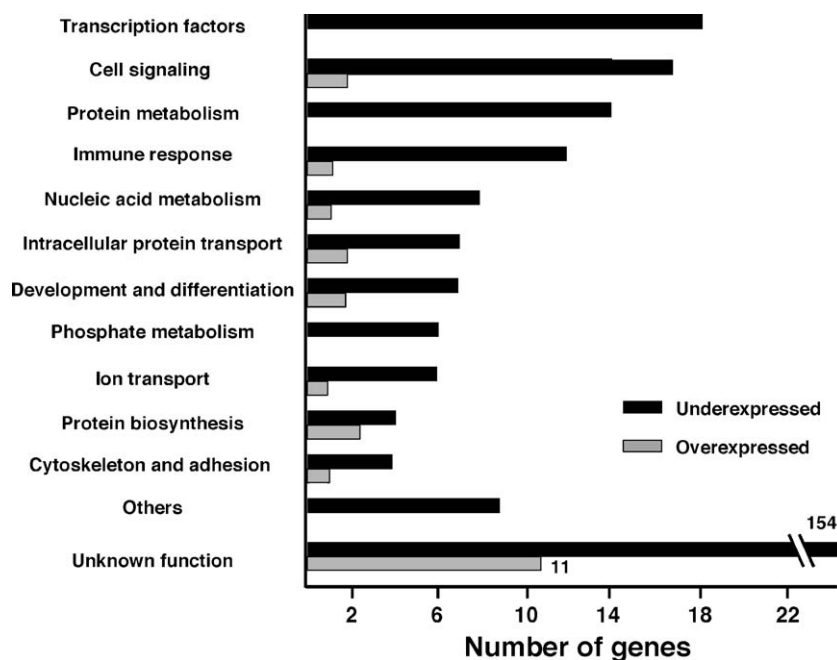
### Role of hCLE on influenza infection

Taking into consideration the association of hCLE with the different forms of the RNAP II, which can be the function of hCLE in the context of the influenza virus infection? As previously described, hCLE/CGI-99 was found associated to the PA polymerase subunit of the influenza virus and to active reconstituted viral RNPs.<sup>1</sup> It is worthwhile remembering that viral transcription must be functionally associated to cellular transcription, as 5' capped-oligonucleotides are required as primers for viral transcription. In agreement with that, it has been shown that influenza virus polymerase binds to the hypophosphorylated RNAP II and RNAP II Ser5-P, suggesting that it targets actively transcribing RNAP II.<sup>8</sup> As the RNAP II Ser5-P is engaged in transcription initiation, the presence of hCLE in RNAP II-containing complexes, could be a way of placing the viral polymerase close to the sites of generation of the 5' capped premessengers. Therefore, it is possible that influenza polymerase uses the binding to hCLE as a physical link with the cellular transcription machinery to locate the viral polymerase close to those intranuclear sites where the generation of cap-premRNAs is taking place.

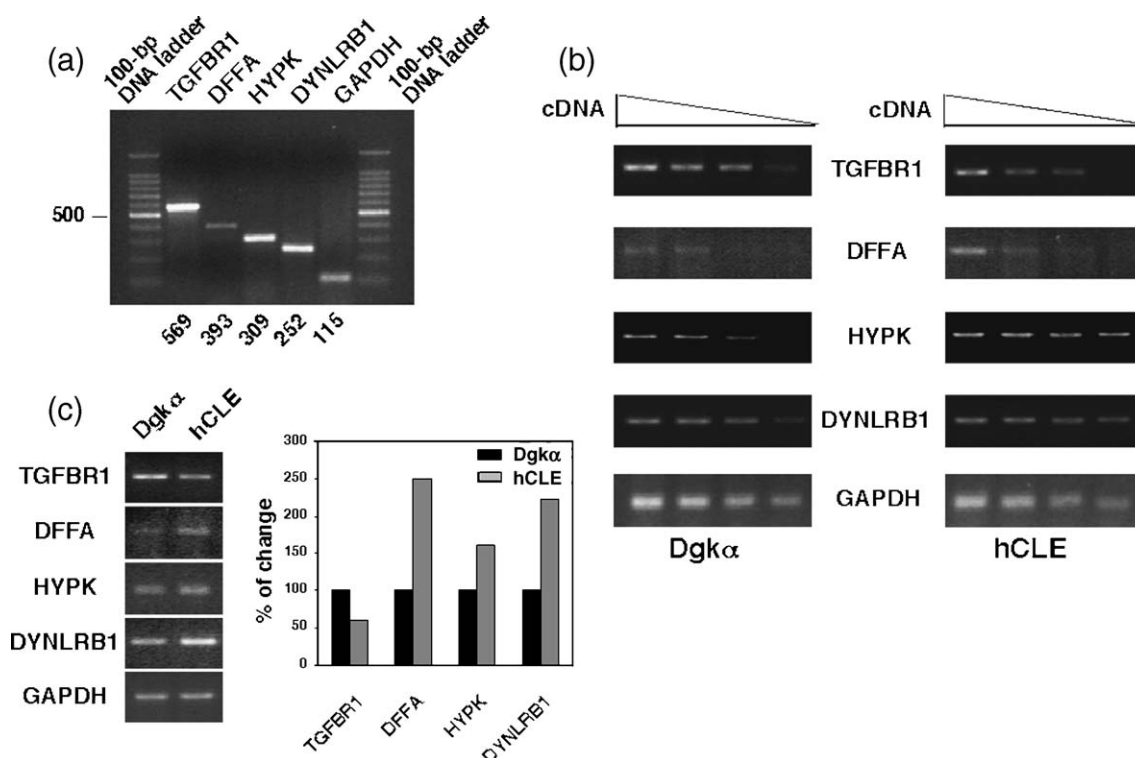
### Potential roles for hCLE in gene expression

There are many reports that point out the main role of the RNA polymerase II CTD in the coupling of transcription, capping, splicing and polyadenylation, recruiting different multiprotein complexes





**Figure 5.** Functional classification of the genes differentially expressed in hCLE-silenced cells. Genes were grouped into Gene Ontology categories with the assistance of *fatigo* data base. Black bars represent down-regulated genes and grey bars up-regulated genes in hCLE-silenced cells.



**Figure 6.** Validation of gene array results by semiquantitative RT-PCR. The RNA expression of TGFBR1, DYNLRB1, HYPK, DFFA and GAPDH genes, was analyzed by semiquantitative RT-PCR as described in Materials and Methods. (a) A representative gel showing the sizes of the specific RT-PCR amplification products. The expected sizes are indicated at the bottom; the 100 bp DNA ladder is shown on the left. (b) RT-PCR products of the corresponding genes using the same RNA samples used in the microarray of HEK293T cells transfected with pSUPER-Dgkα (Dgkα) or pSUPER-hCLE (hCLE) plasmids. Each reaction contained decreasing amounts of cDNA (1:2 serial dilution) as indicated by the descending triangle and two different RNA pools were analyzed. (c) Quantification of gene expression of the corresponding genes after normalization with GAPDH control for each sample. The expression level of each gene in Dgkα samples was referred to as 100.

and coordinating the different steps of mRNA synthesis. Reversible phosphorylation of the RNAP II CTD plays a key role in the progression of RNAP II through the transcription cycle.<sup>40</sup> In contrast to the capping and splicing factors that have been found associated specifically to the RNAP II Ser2-P,<sup>41,42</sup> the phosphorylation status of the CTD does not affect the association of CstF (cleavage stimulation factor) components with the RNAP II (see Hirose and Manley for a review<sup>43</sup>). This factor is required for the processing of the 3' end of the messenger RNA and consistent with these reports, the CstF-64 yeast homologue is recruited to promoters and remains associated along the length of several yeast genes.<sup>44</sup>

Several data might indicate an additional function of hCLE in pre-mRNA processing, besides its role as transcriptional modulator. In addition to the hCLE-RNAP II association that is independent of the phosphorylation degree of the CTD, hCLE binds to DDX1 in neuronal RNA-transporting granules.<sup>20</sup> DDX1 protein is a component of the CstF<sup>25,45</sup> and associates to proteins that are present in transcription initiation and elongation complexes<sup>20</sup> and bind directly to both the hypophosphorylated and hyperphosphorylated forms of the CTD.<sup>46</sup> DDX1 and these proteins have been identified in complexes that operate in different processes, including pre-mRNA processing and transcription. Taking all of these data into consideration it is plausible that hCLE, besides its role as a modulator of the mRNA transcription, could be engaged in different steps of the mRNA processing by its association to protein factors that are involved in different steps of pre-mRNA maturation.

Finally, it seems that hCLE should be present in different multiprotein complexes that could be involved in a diversity of cellular functions. The isolation, characterization and further knowledge of these hCLE protein partners, requires additional studies and would provide clues about the possible roles and molecular mechanisms that should govern the global activity of hCLE. Nevertheless, the present study points out the importance of the presence of hCLE in the transcription complexes and allows its definition as a new positive modulator of the RNA polymerase II activity.

## Materials and Methods

### Biological materials

HEK293T and MDCK cell lines were used throughout. Antiserum specific for hCLE was prepared by hyperimmunization of rabbits with purified His-hCLE as described.<sup>1</sup> Rat polyclonal antibody anti-BrdUridine was obtained from Abcam and mouse monoclonal antibody anti- $\beta$ -tubulin and  $\alpha$ -amanitin were from Sigma.

### Construction of plasmids

To generate the pSUPER-hCLE plasmid to silence the hCLE gene sense (5'GATCCCCAAGATTGAAGACAGAGGGAATTTTCAAGAGAAAATCCCTCTGTCTTCAA-

TCTTTTTTGGAAA) and antisense (5'AGCTTTTCCA-AAAAAAGATTGAAGACAGAGGGAATTTTCTCTTGAAAAATCCCTCTGTCTTCAATCTTGGG 3') oligonucleotides, corresponding to the mRNA of hCLE gene and containing BglII and HindIII sites, were hybridized and ligated to the pSUPER plasmid digested with these enzymes.<sup>31</sup> The short-hairpin RNA generated by this plasmid showed no homology to other gene sequences when using BLAST. To create pSUPER-Dgk $\alpha$  plasmid used as negative control in silencing experiments, the oligonucleotide (5'GATCCCCGCCAGAAGACCATGG-ATGATTCAAGAGATCATCCATGGTCTTCTGGC-TTTTGGAAA 3') was used as sense sequence and (5'AGCTTTTCCA AAAAAGCCAGAAGACCATGGATGATC-TCTTGAATCATCCATGGTCTTCTGGCGGG) as antisense oligonucleotide.

### Immunofluorescence

MDCK cells were fixed with 3.7% formalin for 20 min at room temperature and stored in PBS. Fixed cells were permeabilized and incubated with the following primary antibodies: anti-hCLE (1:500), anti-RNAP II Ser2-P (H5) (1:100), anti-RNAP II Ser5-P (H14) (1:100) or anti-RNAP II unphosphorylated Ser2 (8WG16) (1:100) monoclonal antibodies from BabCo in PBS/0.1% (w/v) BSA. Confocal microscopy was performed with a Bio-Rad Radiance 2100 laser scanning system on a Zeiss Axiovert 200 microscope. Images of 1024  $\times$  1024 pixels and an eight bit gray scale depth were acquired sequentially every 0.2–0.3  $\mu$ m employing LaserSharp v5.0 software (Bio-Rad) and analyzed using LaserPix v.4 image program (Bio-Rad). The colocalization mask was used for colocalization analysis. All the experiments were repeated at least three times and a representative experiment is shown.

### RNA analysis

#### *In situ* RNA synthesis

For *in situ* RNA synthesis followed by immunofluorescence studies, MDCK cells were grown on microscope cover glasses. Detection of *in situ* RNA synthesis by Br-UTP incorporation was adapted from a previous report.<sup>47</sup> Cultures were washed once with TBS at 4 °C and then washed for 10 min at 4 °C with glycerol buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25% glycerol, 0.5 mM PMSE, 0.5 mM EGTA). Cells were then permeabilized for 3 min at 4 °C with glycerol buffer plus 1 mM DTT, 25 units/ml human placental ribonuclease inhibitor (HPRI) from Amersham, 0.05% Triton X100. After washing with TBS, cells were incubated in transcription buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EGTA, 25% glycerol, 1 mM DTT, 25 units/ml HPRI, 0.5 mM PMSE, 1.8 mM ATP, 0.5 mM CTP, 0.5 mM GTP with or without 5  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -amanitin) and 1 mM Br-UTP for 60 min at room temperature and washed twice with TBS plus 25 units/ml HPRI and 1 mM DTT. Finally, to analyze the Br-UTP incorporation, the cells were fixed for 20 min at room temperature in 3.7% formalin, washed with PBS and processed for confocal microscopy as indicated above. RNA synthesis was monitored with anti-BrdU antibody (1:100).

#### *In vitro* RNA synthesis

To analyze the RNA synthesis in isolated nuclei of hCLE silenced cells, cultures of HEK293T cells were

transfected with the indicated pSUPER plasmids by the calcium phosphate method,<sup>48</sup> the nuclei were isolated 48 h post-transfection as described<sup>49</sup> and frozen in liquid nitrogen. These nuclei were used to perform *in vitro* RNA synthesis by incorporation of a labeled ribonucleotide during a 10 min pulse, with or without  $\alpha$ -amanitin (5  $\mu$ g/ml) to evaluate the RNAP II-directed RNA synthesis, as described.<sup>49</sup> The RNA was isolated by phenol-extraction and ethanol-precipitation. Finally, total RNAs were applied to denaturing gels and after quantification by ethidium bromide staining in a Bio-Rad Chemi Doc equipment, transferred to nylon membranes and the radioactivity was quantified in a phosphorimager.

#### Northern blot

Total RNA was isolated using the Ultraspec RNA Isolation Reagent from Biotex and treated with 40  $\mu$ g/ml of RNase-free DNase I and 25 units/ml HPRI for 15 min at 30 °C. Northern blots were performed using standard conditions<sup>49</sup> and the filters were hybridized with a negative-polarity riboprobe to detect RNA levels of hCLE gene.

#### Co-immunoprecipitation

For co-immunoprecipitation studies, nuclei of HEK293T cells were prepared as described above and transcriptionally active nuclear extracts obtained as reported.<sup>50</sup> The extracts were incubated with the corresponding antibodies as reported<sup>51</sup> and the co-immunoprecipitated proteins were analyzed by Western blotting that was done as described.<sup>1</sup> The primary antibodies used were a rabbit anti-hCLE serum (1:1000) for hCLE protein and monoclonal antibodies 8WG16, H14 and H5 (1:500) each for RNA polymerase II.

#### RNA isolation and DNA microarray

Cultures of HEK293T cells were transfected with pSUPER-Dgk $\alpha$  or pSUPER-hCLE plasmids and at 48 h post-transfection total RNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Further purification was carried out using the RNeasy Clean-Up protocol (Qiagen, Valencia, CA). Quantification and integrity of the RNA was assessed in a Bionalyzer 2100 (Agilent) by  $A_{260/280}$  absorption. Three different RNA pools containing 10  $\mu$ g of total RNA derived from three independent experiments performed in triplicate were used.

Aminosilane-coated slides containing 32,256 spots (corresponding to 22,264 unigenes) representing the Human oligo set from Qiagen-Operon, obtained from the University of Cincinnati<sup>†</sup>, were hybridized by conventional methods with RNA probes labelled with either Cy3 or Cy5 Mono NHS Esters (Cy<sup>TM</sup>Dye Post-labelling Reactive Dye Pack, Amersham). "Dye-swap" labelling was used in half of the replicated hybridizations in order to correct for gene-specific dye bias. Images from Cy3 and Cy5 channels were equilibrated and captured with a GenePix 4000B (Axon) and spots quantified using GenPix software (Axon).

#### Microarray data analysis

Normalization and statistical analysis of the expression data were performed by using the LIMMA software package.<sup>52</sup> For local background correction we used the "normexp" method in LIMMA to adjust the local median background estimates. The resulting log-ratios were print-tip loess normalized for each array. To have similar distribution across arrays and to achieve consistency among arrays, log-ratio values were scaled using as scale estimator the median-absolute-value.<sup>52</sup> To assess the differential expression in conditions of hCLE silencing a linear model was used. Each probe was tested for changes in expression over replicates by using a moderated *t* statistic.<sup>52</sup> To control the false discovery rate (FDR), *p*-values were corrected by using the method of Benjamini and Hochberg.<sup>53</sup> To select differentially expressed genes in conditions of hCLE knock-down two criteria were used: FDR <10% and a fold change greater than 1.0. Values were considered to be significant if the corrected *p*-values were <0.1 and 2,322 differentially expressed genes emerged. Finally, establishing the criterion of a fold change greater than 1.5 at three replicas a total of 290 genes differentially expressed in conditions of hCLE knock-down appeared.

#### Semiquantitative RT-PCR and primers

The genes TGFBR1 (Transforming growth factor, beta receptor I), DYNLRB1 (Dynein light chain 2A), HYPK (Huntingtin interacting protein K) and DFFA (DNA fragmentation factor) identified among the regulated genes by hCLE knock-down were analyzed using semi-quantitative RT-PCR to validate the array data. RNA templates were reversed-transcribed into cDNA for 1 h at 45 °C by using AMV reverse transcriptase (Promega) according to the manufacturer's instructions. The enzyme was inactivated by heating 10 min at 75 °C; and the denatured cDNA templates were amplified using Taq polymerase by the following cycles: 94 °C for 10 s, 54 °C for 30 s and 68 °C for 60 s. A final extension was performed for 2 min at 68 °C. To ensure that amplification remained within the linear range, 1:2 serial dilutions of cDNA were made. RT-PCR for GAPDH (25 cycles) was used as a control for mRNA abundance. For the other genes, the number of cycles ranged from 25 to 35. RT-PCR for each gene was performed several times using different batches of cDNA.

The oligonucleotide primer pairs used for each of the genes in this study corresponded to the following nucleotides: TGFBR1, 737–751 and 1288–1304 NM\_004612; DYNLRB1, 63–78 and 297–315 NM\_014183; HYPK, 221–237 and 513–530 NM\_016400 and DFFA, 695–711 and 1071–1088 NM\_004401. Amplified PCR products were visualized on a 2% (w/v) agarose gel. Amplification yielded the predicted size of the respective amplified fragments.

#### Acknowledgements

We are indebted to the transcriptomics facility of the Centro Nacional de Biotecnología, C.S.I.C., Madrid, Spain, that performed the microarray studies. We thank C. Suñe for his help during the course of this work. We also thank N. Brewster and

<sup>†</sup> <http://www.microarray.uc.edu/Resources/genelist.htm>



R. Singer for performing studies of hCLE in yeast. We are indebted to J. Ortin and T. Lutz for critical review of the manuscript. The technical assistance of S. Gutierrez with the confocal microscopy studies is gratefully acknowledged. We also thank Y. Fernandez, J. Fernandez and C. Enriquez for their technical support.

A. P.-G. was a fellow from the Fondo de Investigaciones Sanitarias and A. R. from Programa Nacional de Formación de Personal Universitario. This work was supported by Programa Sectorial de Promoción General del Conocimiento (grants BMC2002-01141 and BFU2005-02834).

## References

- Huarte, M., Sanz-Ezquerro, J. J., Roncal, F., Ortin, J. & Nieto, A. (2001). PA subunit from influenza virus polymerase complex interacts with a cellular protein with homology to a family of transcriptional activators. *J. Virol.* **75**, 8597–8604.
- Horisberger, M. A. (1980). The large P proteins of influenza A viruses are composed of one acidic and two basic polypeptides. *Virology*, **107**, 302–305.
- Detjen, B. M., St. Angelo, C., Katze, M. G. & Krug, R. M. (1987). The three influenza virus polymerase (P) proteins not associated with viral nucleocapsids in the infected cell are in the form of a complex. *J. Virol.* **61**, 16–22.
- Honda, A., Mukaigawa, J., Yokoiyama, A., Kato, A., Ueda, S., Nagata, K. *et al.* (1990). Purification and molecular structure of RNA polymerase from influenza virus A/PR8. *J. Biochem. Tokyo*, **107**, 624–628.
- Elton, D., Digard, P., Tiley, L. & Ortin, J. (2005). Structure and function of the influenza virus RNP. In *Contemporary Topics in Influenza Virology* (Kawaoka, Y., ed.), Horizon Scientific Press, Norfolk, VA.
- Bouloy, M., Plotch, S. J. & Krug, R. M. (1978). Globin mRNAs are primers for the transcription of influenza viral RNA *in vitro*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **75**, 4886–4890.
- Plotch, S. J., Bouloy, M., Ulmanen, I. & Krug, R. M. (1981). A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell*, **23**, 847–858.
- Engelhardt, O. G., Smith, M. & Fodor, E. (2005). Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II. *J. Virol.* **79**, 5812–5818.
- Brewster, N. K., Johnston, G. C. & Singer, R. A. (1998). Characterization of the CP complex, an abundant dimer of Cdc68 and Pob3 proteins that regulates yeast transcriptional activation and chromatin repression. *J. Biol. Chem.* **273**, 21972–21979.
- Okuhara, K., Ohta, K., Seo, H., Shioda, M., Yamada, T., Tanaka, Y. *et al.* (1999). A DNA unwinding factor involved in DNA replication in cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *Curr. Biol.* **9**, 341–350.
- Sliter, T. J. & Gilbert, L. I. (1992). Developmental arrest and ecdysteroid deficiency resulting from mutations at the *dre4* locus of *Drosophila*. *Genetics*, **130**, 555–568.
- Orphanides, G., Wu, W.-H., Lane, W. S., Hampsey, M. & Reinberg, D. (1999). The chromatin-specific transcription elongation factor FACT comprises human SPT16 and SSRP1 proteins. *Nature*, **400**, 284–288.
- Duroux, M., Houben, A., Ruzicka, K., Frimi, J. & Grasser, D. (2004). The chromatin remodelling complex FACT associates with actively transcribed regions of the Arabidopsis genome. *Plant J.* **40**, 660–671.
- Orphanides, G., LeRoy, G., Chang, C. H., Luse, D. S. & Reinberg, D. (1998). FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes. *Cell*, **92**, 105–116.
- Krogan, N. J., Kim, M., Ahn, S. H., Zhong, G., Kobor, M. S., Cagney, G. *et al.* (2002). RNA polymerase II elongation factors of *Saccharomyces cerevisiae*: a targeted proteomics approach. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 6979–6992.
- Squazzo, S. L., Costa, P. J., Lindstrom, D. L., Kumer, K. E., Simic, R., Jennings, J. L. *et al.* (2002). The Paf1 complex physically and functionally associates with transcription elongation factors. *EMBO J.* **21**, 1764–1774.
- Saunders, A., Werner, J., Andrusis, E. D., Nakayama, T., Hirose, S., Reinberg, D. & Lis, J. T. (2003). Tracing FACT and the RNA polymerase II elongation complex through chromatin *in vivo*. *Science*, **301**, 1094–1096.
- Belotserkovskaya, R., Saunders, A., Lis, J. T. & Reinberg, D. (2004). Transcription through chromatin: understanding a complex FACT. *Biochim. Biophys. Acta*, **1677**, 87–99.
- Belotserkovskaya, R., Oh, S., Bondarenko, V. A., Orphanides, G., Studitsky, V. M. & Reinberg, D. (2003). FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science*, **301**, 1090–1093.
- Kanai, Y., Dohmae, N. & Hirokawa, N. (2004). Kinesin transport RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron*, **43**, 513–525.
- Marión, R. M., Fortes, P., Beloso, A., Dotti, C. & Ortin, J. (1999). A human sequence homologue of Staufén is an RNA binding protein that is associated to polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2212–2219.
- Falcón, A., Fortes, P., Marión, R. M., Beloso, A. & Ortin, J. (1999). Interaction of influenza virus NS1 protein and the human homologue of Staufén *in vivo* and *in vitro*. *Nucl. Acids Res.* **27**, 2241–2247.
- Rocak, S. & Linder, P. (2004). DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* **5**, 232–241.
- Chen, H.-C., Lin, W.-C., Tsay, Y.-G., Lee, S.-C. & Chang, C.-J. (2002). An RNA helicase, DDX1, interacting poly(A) RNA and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K. *J. Biol. Chem.* **277**, 40403–40409.
- Bleoo, S., Sun, X., Hendzel, M. J., Rowe, J. M., Packer, M. & Godbault, R. (2001). Association of human DEAD box protein DDX1 with a cleavage stimulation factor involved in 3'-end processing of pre-mRNA. *Mol. Biol. Cell*, **12**, 3046–3059.
- Palancade, B. & Bensaude, O. (2003). Investigating RNA polymerase II carboxyl-terminal domain (CTD) phosphorylation. *Eur. J. Biochem.* **270**, 3859–3870.
- Kobor, M. S. & Greenblatt, J. (2002). Regulation of transcription elongation by phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1577**, 261–275.
- Kumaran, R. I., Muralikrishna, B. & Parnaik, V. K. (2002). Lamin A/C speckles mediate spatial organization of splicing factor compartments and RNA polymerase II transcription. *J. Cell. Biol.* **159**, 783–793.
- Zhu, X., Zeng, X., Huang, B. & Hao, S. (2004). Actin is closely associated with RNA polymerase II and involved in activation of gene transcription. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **321**, 623–630.



30. Vaisius, A. C. & Wieland, T. (1982). Formation of a single phosphodiester bond by RNA polymerase B from calf thymus is not inhibited by alpha-amanitin. *Biochemistry*, **21**, 3097–3101.
31. Brummelkamp, T. R., Bernards, R. & Agami, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, **296**, 550–552.
32. Avila-Flores, A., Santos, T., Rincon, E. & Merida, I. (2005). Modulation of the mTOR pathway by diacylglycerol kinase-produced phosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* **280**, 10091–10099.
33. Al-Shahrour, F., Diaz-Uriarte, R. & Dopazo, J. (2004). FatIGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes. *Bioinformatics*, **20**, 578–580.
34. Corden, J. L., Cadena, J. M., Ahearn, J. M. & Dahmus, M. E. (1985). A unique structure at the carboxy terminus of the largest subunit of eukaryotic RNA polymerase II. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **82**, 7934–7938.
35. Hernandez, N. (1993). TBP, a universal eukaryotic transcription factor? *Genes Dev.* **7**, 1291–1308.
36. Yang, J. P., Hori, M., Sanda, T. & Okamoto, T. (1999). Identification of a novel inhibitor of nuclear factor-kappaB, RelA-associated inhibitor. *J. Biol. Chem.* **274**, 15662–15670.
37. Wittig, I. & Groner, B. (2005). Signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5), a crucial regulator of immune and cancer cells. *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* **5**, 449–463.
38. Lee, S. W., Cho, B. H., Park, S. G. & Kim, S. (2004). Aminoacyl-tRNA synthetase complexes: beyond translation. *J. Cell Sci.* **117**, 3725–3734.
39. Taylor, S. S., Haste, N. M. & Ghosh, G. (2005). PKR and eIF2alpha: integration of kinase dimerization, activation, and substrate docking. *Cell*, **122**, 823–825.
40. Dahmus, M. E. (1996). Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* **271**, 19009–19012.
41. Cho, E. J., Rodriguez, C. R., Takagi, T. & Buratowski, S. (1998). Allosteric interactions between capping enzyme subunits and the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev.* **12**, 3482–3487.
42. Yue, Z., Maldonado, E., Pillutla, R., Cho, H., Reinberg, D. & Shatkin, A. J. (1997). Mammalian capping enzyme complements mutant *Saccharomyces cerevisiae* lacking mRNA guanylyltransferase and selectively binds the elongating form of RNA polymerase II. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **94**, 12898–12903.
43. Hirose, Y. & Manley, J. L. (2000). RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes Dev.* **14**, 1415–1429.
44. Calvo, O. & Manley, J. L. (2005). The transcriptional coactivator PC4/Sub1 has multiple functions in RNA polymerase II transcription. *EMBO J.* **24**, 1009–1020.
45. Li, L., Roy, K., Katyal, S., Sun, X., Bleoo, S. & Godbout, R. (2006). Dynamic nature of cleavage bodies and their spatial relationship to DDX1 bodies, Cajal bodies, and gems. *Mol. Biol. Cell*, **17**, 1126–1140.
46. Emili, A., Shales, M., McCracken, S., Xie, W., Tucker, P. W., Kobayashi, R., Blencowe, B. J. & Ingles, C. J. (2002). Splicing and transcription-associated protein PSF and p54nrb/nonO bind to the RNA polymerase II CTD. *RNA*, **8**, 1102–1111.
47. Wansink, D. G., Schul, W., van der Kraan, I., van Steensel, B., van Driel, R. & de Jong, L. (1993). Fluorescence labeling of nascent RNA reveals transcription by RNA polymerase II in domains scattered throughout the nucleus. *J. Cell Biol.* **122**, 283–293.
48. Wigler, M., Pellicer, A., Silverstein, S., Axel, R., Urlaub, G. & Chasin, L. (1979). DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus into mammalian cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **76**, 1373–1376.
49. Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd edit, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edit Cold Spring Harbor, New York.
50. Dignam, J. D., Levovitz, R. M. & Roeder, R. G. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucl. Acids Res.* **11**, 1475–1488.
51. Sanz-Ezquerro, J. J., de la Luna, S., Ortin, J. & Nieto, A. (1995). Individual expression of influenza virus PA protein induces degradation of coexpressed proteins. *J. Virol.* **69**, 2420–2426.
52. Smyth, G. K., Michaud, J. & Scott, H. S. (2005). Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics*, **21**, 2067–2075.
53. Benjamini, Y., Drai, D., Elmer, G., Kafkafi, N. & Golani, I. (2001). Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav. Brain Res.* **125**, 279–284.

Edited by J. Karn

(Received 12 May 2006; received in revised form 28 July 2006; accepted 31 July 2006)  
Available online 3 August 2006

## Influenza Virus Infection Causes Specific Degradation of the Largest Subunit of Cellular RNA Polymerase II<sup>▽</sup>

A. Rodríguez,<sup>†</sup> A. Pérez-González,<sup>†</sup> and A. Nieto\*

*Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain*

Received 28 September 2006/Accepted 28 February 2007

**It has been described that influenza virus polymerase associates with RNA polymerase II (RNAP II). To gain information about the role of this interaction, we explored if changes in RNAP II occur during infection. Here we show that influenza virus causes the specific degradation of the hypophosphorylated form of the largest subunit of RNAP II without affecting the accumulation of its hyperphosphorylated forms. This effect is independent of the viral strain and the origin of the cells used. Analysis of synthesized mRNAs in isolated nuclei of infected cells indicated that transcription decreases concomitantly with RNAP II degradation. Moreover, this degradation correlated with the onset of viral transcription and replication. The ubiquitin-mediated proteasome pathway is not involved in virally induced RNAP II proteolysis. The expression of viral polymerase from its cloned cDNAs was sufficient to cause the degradation. Since the PA polymerase subunit has proteolytic activity, we tested its participation in the process. A recombinant virus that encodes a PA point mutant with decreased proteolytic activity and that has defects in replication delayed the effect, suggesting that PA's contribution to RNAP II degradation occurs during infection.**

The genome of influenza virus consists of eight single-stranded RNA molecules of negative polarity. The viral RNA polymerase is composed of three subunits, PB1, PB2, and PA (16, 26, 27), which together with the nucleoprotein perform all the activities required for viral RNA expression (15, 18, 28, 33). The PB2 subunit is able to bind cap 1 structures of host cell hnRNAs (8, 57). The PB1 subunit contains both sequence motifs typical of the viral RNA-dependent RNA polymerases (46), which are essential for RNA synthesis (7), and the endonuclease activity responsible for the cleavage of host mRNA precursors (35). The PA subunit is a phosphoprotein with proteolytic activity (25, 40, 50, 51). The phenotype of viral temperature-sensitive and protease mutants suggests that the PA subunit may be involved in the transition from mRNA transcription to replication (29, 37). The transcription process involves a cap-stealing mechanism by which 5'-capped oligonucleotides derived from newly synthesized RNA polymerase II (RNAP II) transcripts are used as primers and elongated by the viral polymerase (9, 45). In line with this transcription strategy, parental virion RNPs colocalize with active RNAP II in the infected-cell nucleus (I. Salanueva, personal communication). Due to the requirements for cellular capped mRNAs, virus transcription is inhibited by actinomycin D or  $\alpha$ -amanitin (38). Viral RNA replication involves the synthesis of cap-independent, full-length positive-stranded RNAs complementary to the genomic viral RNAs (vRNAs), which serve as templates for amplification of the vRNAs and are not sensitive to actinomycin D or  $\alpha$ -amanitin (53).

Many viruses induce alterations in host cell gene expression. Among these, changes in the transcriptional machinery of the

infected cells are broadly documented. RNAP II, a multiprotein complex composed of 12 subunits, is the enzyme responsible for the transcription of mRNAs. Two major forms of RNAP II are found in cells, hyperphosphorylated and hypophosphorylated on the carboxy-terminal domain (CTD) of its largest subunit. The CTD consists of more than 50 repeats of the Y<sub>1</sub>S<sub>2</sub>P<sub>3</sub>T<sub>4</sub>S<sub>5</sub>P<sub>6</sub>S<sub>7</sub> heptapeptide (12), with Ser-2 and Ser-5 (boldface) being the main phosphoacceptor residues (see reference 42 for a review). It has been reported that serine 5 phosphorylation is detected at the promoter region of the transcribing genes, whereas serine 2 phosphorylation is increased as RNAP II leaves the promoter and transcribes the body of the gene. Several cyclin-dependent kinases phosphorylate the CTD. Among them CDK7, a subunit of the transcription factor TFIIF, and CDK9, a subunit of the elongation factor P-TEFb, are found. These kinases associate with one of the several regulatory cyclin T proteins (6, 47, 54). There are many examples of viruses that modify the RNAP II CTD to improve their replication, including human immunodeficiency virus type 1 (13, 31, 59), cytomegalovirus (55), herpes simplex virus type 1 (HSV-1) (14, 17, 21), Epstein-Barr virus (5), and Bunyamwera virus (56).

It has been found that the RNA polymerase complex of influenza virus interacts with the largest subunit of the RNAP II via the CTD. The viral polymerase binds to the hypo- and hyperphosphorylated forms of RNAP II, suggesting that it targets actively transcribing RNAP II (19). We previously identified the cellular protein hCLE/CGI-99 as a factor interacting with the PA subunit of the influenza virus polymerase that associates with active, purified viral RNPs reconstituted in vivo (30). We have also shown that hCLE is a new positive transcription modulator of RNAP II that is present in complexes with both the hypo- and hyperphosphorylated forms of RNAP II (44). All these data prompted us to explore if changes in RNAP II levels or in its phosphorylation pattern occur during influenza virus infection.

\* Corresponding author. Mailing address: Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain. Phone: 34 91 5854914. Fax: 34 91 5854506. E-mail: anmartin@cnb.uam.es.

<sup>†</sup> A. Rodríguez and A. Pérez-González contributed equally to this work.

<sup>▽</sup> Published ahead of print on 7 March 2007.

MATERIALS AND METHODS

**Biological materials.** The cell lines used in this study were HEK293T and HeLa (human), COS-1 (monkey), NIH 3T3 (mouse), and NLB2 (canine). The influenza virus A/Victoria/3/75 (VIC) and A/WSN/33 (WSN) strains were used. Recombinant viruses containing PA, PB1, PB2, and NP genes from the VIC strain and all other genes from the WSN strain, with either wild-type PA or the T157A PA mutant, have been described previously (29). Plasmids pCMVPA, pCMVPB1, and pCMVPB2 have been described previously (20).  $\alpha$ -Amanitin and proteasome inhibitor MG132 were from Sigma. The protease inhibitor "Complete" was from Roche.

**Virus infection and transfection.** Cells were infected at a multiplicity of infection of 3 PFU/cell. At different hours postinfection (hpi), the cells were collected in phosphate-buffered saline with protease ("Complete") and phosphatase (500  $\mu$ M sodium orthovanadate, 500  $\mu$ M  $\beta$ -glycerophosphate, and 500  $\mu$ M sodium molybdate) inhibitors, and the cell pellet was resuspended in Laemmli sample buffer (49).

Cell cultures were transfected by the calcium phosphate method (58) with pCMV plasmids expressing PB1, PB2, or PA. After 16 hours of transfection, the cells were collected and used for Western blot analysis.

**Western blotting.** Western blotting was done as described previously (30). The following primary antibodies were used: for RNAP II, monoclonal antibodies 8WG16 (1:500), H14 (1:500), and H5 (1:500) from BabCo; for the N-terminal part of the largest RNAP II subunit, polyclonal antibody N-20 from Santa Cruz (1:500); for PA, monoclonal antibodies 2 and 14 (1:20 each) (4); for PB1, a rabbit polyclonal antibody (1:1,000) (24); for PB2, monoclonal antibodies 8 and 28 (1:100 each) (2); for NP protein, a rat polyclonal antibody generated using as antigen a His-NP protein expressed and purified from bacteria (1:2,000); for translation initiation factor 4GI (eIF4GI), a mixture of four rabbit polyclonal antibodies (1:8,000 each) (1); for  $\beta$ -tubulin, a mouse monoclonal antibody (1:15,000) from Sigma; for cyclin T1, a goat polyclonal antibody (1:1,000) from Santa Cruz; for CDK7, a mouse monoclonal antibody (1:1,000) from Santa Cruz; and for ubiquitin, a rabbit polyclonal antibody (1:1,000) from Santa Cruz.

**In vitro RNA synthesis.** To analyze total RNA synthesis, cultures of HEK293T cells were mock infected or infected with the VIC or WSN strain and their nuclei were isolated and frozen. These nuclei were used to detect in vitro RNA synthesis by incorporation of [ $\alpha$ - $^{32}$ P]GTP (250  $\mu$ Ci/ml) during a 30-min pulse, with or without  $\alpha$ -amanitin (5  $\mu$ g/ml), as described previously (49). After in vitro RNA synthesis, total RNAs were isolated by phenol extraction and ethanol precipitation. The RNAs were quantified by ethidium bromide staining in Bio-Rad Chemi Doc equipment. The radioactivity was quantitated in a phosphorimager after blotting to a nylon membrane.

To analyze the synthesis of hStaufen-1, vimentin, and  $\beta$ -tubulin mRNAs, the in vitro-synthesized RNAs using isolated nuclei from either mock- or influenza virus-infected cells were used as probes for runoff experiments (49). Five hundred nanograms of the corresponding coding sequences was spotted and fixed to nylon membranes and hybridized with the labeled RNAs, and the label was quantitated in a phosphorimager.

**Detection of viral RNAs.** Total RNA from infected HEK293T cells was isolated using the Ultraspec RNA isolation reagent from Biotex. Northern blotting was performed using standard conditions (49), and the membranes were hybridized with oligonucleotide probes radiolabeled with [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP. The probes recognized NP positive sense RNA or vRNA from VIC and WSN strains, and their sequences were 5'-GTCTTCGAGCTCTCGGAC-3' and 5'-TCTTAGGATCTT TCCCGC-3', respectively.

**Pulse-chase experiments.** Cultures of HEK293T cells were starved for 2 h in methionine- and cysteine-free Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) and labeled for 1 h with a mixture of [ $^{35}$ S]Met/Cys (Promix; Amersham) in 100  $\mu$ l of the same medium. The chase was carried out by extensive washing with DMEM and incubation in 500  $\mu$ l of DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum. Finally, cells were washed with phosphate-buffered saline buffer, resuspended in 200  $\mu$ l of DMEM, and used for immunoprecipitation assays as reported previously (50).

**Metabolic labeling.** HEK293T cells were mock infected or infected with the VIC strain at a multiplicity of infection of 3 PFU/cell. The cells that were treated with  $\alpha$ -amanitin received the treatment at various times postinfection, and the cells tested at 0 hpi were pretreated 1.5 h before the infection. In all cases, the drug was present from its addition until the end of the infection (8 h). At 7 hpi the cells were washed and incubated for 1 hour in the culture medium containing [ $^{35}$ S]Met/Cys.

TABLE 1. Phosphorylation dependence of anti-CTD monoclonal antibodies

Antibody	Epitope (Y <sub>1</sub> S <sub>2</sub> P <sub>3</sub> T <sub>4</sub> S <sub>5</sub> P <sub>6</sub> S <sub>7</sub> )	Recognition <sup>a</sup>
8WG16	Unphosphorylated	Unphosphorylated repeats (no affinity for repeats containing Ser-2P)
H14	Ser-5P	Ser-5P, Ser-5P + Ser-2P
H5	Ser-2P	Ser-2P, Ser-5P, Ser-2P + Ser-5P

<sup>a</sup> See reference 32.

RESULTS

**Influenza virus infection induces the specific degradation of hypophosphorylated RNAP II.** It has been found that the influenza virus polymerase associates with the hypo- and Ser-5P-hyperphosphorylated forms of RNAP II, whereas Ser-2P RNAP II does not associate with the viral polymerase (19). To check whether such interactions could produce changes in the accumulation or phosphorylation state of RNAP II during influenza virus infection, HEK293T cells were infected with the VIC strain of influenza virus and total cell extracts used for Western blot analysis with antibodies that recognize different phosphorylated forms of RNAP II. These antibodies have been produced using as epitopes different phosphorylated forms of the Y<sub>1</sub>S<sub>2</sub>P<sub>3</sub>T<sub>4</sub>S<sub>5</sub>P<sub>5</sub>S<sub>7</sub> heptapeptide, and their specificities have been extensively studied (42). In Table 1 their recognition pattern for CTD peptides subjected to Biacore analysis is shown (32). As can be observed, 8WG16 antibody mainly detects hypophosphorylated RNAP II; H5 antibody detects phosphorylated RNAP II either at Ser-2 or Ser-5, and H14 antibody detects RNAP II phosphorylated specifically at Ser-5. To assess the progression of the infection, the accumulation levels of nucleoprotein were analyzed and  $\beta$ -tubulin accumulation was also determined as a loading control. Around 4 hpi, the accumulation of the RNAP II forms recognized by the 8WG16 antibody began to decrease, reaching nearly undetectable levels at later times postinfection (10 to 12 h). In contrast, the levels of accumulation of the hyperphosphorylated forms of RNAP II did not show variations as the infection progressed (Fig. 1A). This experiment was repeated more than five times with identical results. The quantitation of the amount of total RNAP II (hypo- plus hyperphosphorylated forms) during influenza virus infection in the representative experiment presented in Fig. 1A is shown at the right of the figure. As observed, a 50% reduction was attained at late times postinfection. Degradation of RNAP II was also observed using an antibody that recognizes the N-terminal part of the largest subunit (Fig. 1, N20). In this case the decline of total RNAP II was lower and mainly affected the RNAP II form with higher electrophoretic mobility, which should correspond to the hypophosphorylated form. On the other hand, no specific cleavage products were found using antibodies that recognize both the N- and C-terminal parts of RNAP II. Thus, these data confirm the above results and indicate that degradation of hypophosphorylated RNAP II does not affect the CTD specifically.

It is well established that influenza virus infection shuts down host cell protein synthesis (1, 22). Depending on the

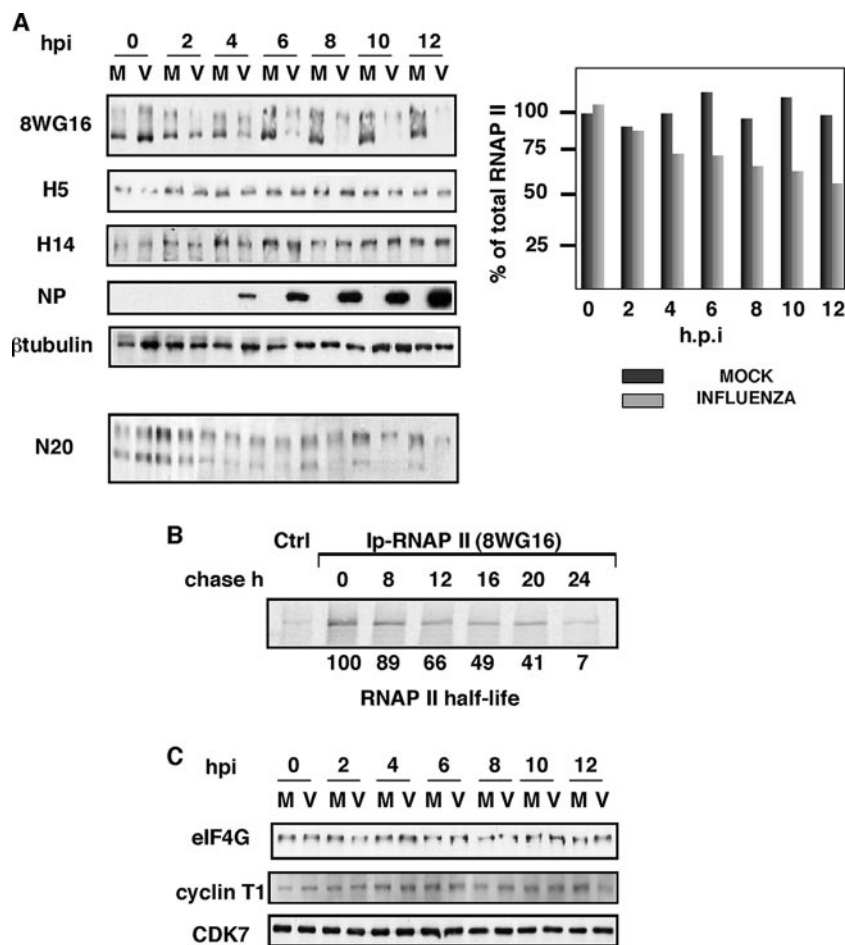


FIG. 1. Influenza virus infection produces degradation of hypophosphorylated RNAP II. (A) HEK293T cells were infected with the VIC strain of influenza virus and at the designated hpi hypophosphorylated RNAP II (8WG16), RNAP II Ser-2P and Ser-5P (H5), RNAP II Ser-5P (H14), total RNAP II (N20), and the indicated proteins were monitored in total cell extracts by Western blotting. Five different experiments were carried out, and a representative experiment is shown. Quantitation of the amount of total RNAP II (hypo- plus hyperphosphorylated forms) during the virus infection is shown at the right. M, mock-infected cells; V, influenza virus-infected cells. (B) Pulse-chase experiments. Synthesis of hypophosphorylated RNAP II was monitored in HEK293T cells with a mixture of [<sup>35</sup>S]Met/Cys. The specific 8WG16 antibody was used to immunoprecipitate (Ip) hypophosphorylated RNAP II. Ctrl, unspecific monoclonal antibody. (C) HEK293T cells were infected with the VIC strain of influenza virus and at the designated hpi the presence of the indicated proteins was monitored in total cell extracts by Western blotting.

half-lives of cellular proteins, their amounts may therefore decline during the time of influenza virus infection. Although the different RNAP II forms come from the same mRNA, it could be argued that the specific decline of the hypophosphorylated form may be the consequence of a particularly short half-life. Thus, we studied the half-lives of the different RNAP II forms. With this aim, pulse-chase experiments were carried out with HEK293T cells followed by immunoprecipitation using specific antibodies as described in Materials and Methods. As can be seen (Fig. 1B), immunoprecipitation with the 8WG16 antibody shows that the half-life of the hypophosphorylated form of the RNAP II is around 16 h, indicating that the observed decrease in the accumulation of this RNAP II form is not the consequence of the block in protein synthesis that occurs upon viral infection. Quantitation of the remaining labeled hypophosphorylated RNAP II during the chase time is shown at the bottom of the figure. Similar half-lives were detected for the hyperphosphorylated forms of RNAP II (data not shown). To assess the specificity of the degradation, we

probed the membranes with an antibody specific for eIF4GI. This translation factor has a half-life greater than 12 h in human cells, but it is very susceptible to degradation (11, 39). In spite of this susceptibility, no variations were found in eIF4GI levels upon influenza virus infection (Fig. 1C). Finally, we analyzed possible changes in the CTD kinases. Thus, the levels of CDK7 and the regulatory cyclin of CDK9, cyclin T1, were analyzed. No variations were found in their accumulation levels during the infection, in agreement with the unchanged levels of the hyperphosphorylated forms of RNAP II (Fig. 1C). To check the validity of this observation for other influenza virus strains, we performed similar experiments using the influenza virus WSN strain (a mouse-adapted strain) to infect HEK293T cells. As shown in Fig. 2A, the WSN strain also produced degradation of the hypophosphorylated RNAP II, similarly to the VIC strain. In this case the degradation was delayed starting at around 6 hpi. To explore if this delay could be the consequence of specific requirements of virus-host cell interactions, the same experiment was performed with NIH



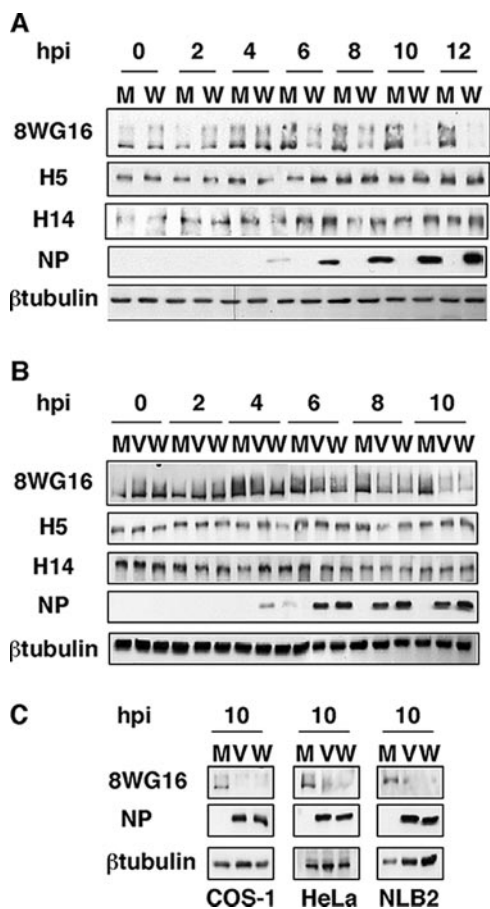


FIG. 2. Degradation of hypophosphorylated RNAP II in different virus-host cell systems. (A) HEK293T cells were mock infected (M) or infected with the WSN strain of influenza virus (W) and processed as for Fig. 1. (B) NIH 3T3 cells were mock infected or infected with the VIC (V) or the WSN strain of influenza virus and processed as for Fig. 1. (C) COS-1, HeLa, and NLB2 cells were mock infected or infected with the VIC or WSN strain of influenza virus, and at 10 hpi the presence of RNAP II (8WG16) and the designated proteins was analyzed by Western blotting.

3T3 cells of mouse origin. The results using WSN and VIC strains (Fig. 2B) show that degradation of hypophosphorylated RNAP II by WSN infection in NIH 3T3 cells starts at around 4 hpi, whereas the VIC strain produces a somewhat delayed degradation in the NIH 3T3 cell line. This observation was obtained in three different experiments, and here we show a representative experiment. These results indicate that the effect occurs independently of the virus strain, although some modulation depending on specific virus-host cell interactions could take place. Finally, we studied the degradation in additional cell lines such as HeLa, COS-1, and NLB2, of human, monkey, and canine origin, respectively. The cells were infected with the VIC and WSN strains and processed as indicated above at 10 hpi. Results are presented in Fig. 2C and show that, independently of the cell origin, influenza virus infection gives rise to a specific degradation of hypophosphorylated RNAP II. Altogether these results indicate that influenza virus infection produces a specific degradation of the

hypophosphorylated form of RNAP II that is independent of the strain and cell origin.

**Dependence of cellular mRNA and viral protein synthesis on active RNAP II.** To study the relationship between the virally induced degradation of the hypophosphorylated RNAP II and its activity, we carried out *in vitro* RNA synthesis. Cultures of HEK293T cells were either mock infected or infected with the VIC or WSN strain, and at the indicated (Fig. 3) hpi the nuclei were isolated. These nuclei were afterward used to perform *in vitro* RNA synthesis with or without  $\alpha$ -amanitin (5  $\mu$ g/ml) to specifically inhibit RNAP II. The RNA synthesis due to RNAP II activity (plus the RNA produced by viral replication in infected cells that is insensitive to  $\alpha$ -amanitin) is calculated as the difference between the values obtained without the drug (total synthesis is synthesis of RNAP I plus RNAP II plus RNAP III) and with the drug (synthesis of RNAP I plus RNAP III). The results are shown in Fig. 3A. The synthesis of cellular mRNAs was unchanged during the 8-h period that was assayed for the mock-infected cells. In contrast, an important inhibition of RNAP II synthesis was observed in the infected cells, which reached its maximum around 4 to 5 hpi and persisted throughout the infection, with an increase at late hpi possibly due to viral replication (see below). To confirm this inhibition, the specific synthesis of several mRNAs corresponding to cellular genes was evaluated. With this aim, *in vitro*-labeled RNAs from either mock- or influenza virus-infected cells were used as probes in runoff experiments using the cDNAs of hStaufen-1,  $\beta$ -tubulin, and vimentin genes. A progressive reduction in the synthesis of these mRNAs during the infection was observed (Fig. 3B). These results indicate that there is inhibition of cellular mRNA synthesis upon influenza virus infection and that this inhibition correlates with the start of degradation of the hypophosphorylated RNAP II.

It has been previously shown that active RNAP II is required for primary transcription of the influenza virus genome and that the presence of  $\alpha$ -amanitin in the infected cells abolishes viral protein production (34). The addition of  $\alpha$ -amanitin during the first 2 h of infection inhibits virus replication, whereas no effect is observed if the drug is added around 4 hpi or later (36). To analyze if there is a correlation between the RNAP II inhibition, its degradation, and its effect on viral progression, we studied the extent of degradation of RNAP II upon  $\alpha$ -amanitin treatment in infected cells. With this aim, HEK293T cells were infected with the VIC strain and treated or not with  $\alpha$ -amanitin (50  $\mu$ g/ml) at the indicated (Fig. 3C) times postinfection. In the treated cells, the drug was present from its addition until the end of the infection (8 h). To estimate the synthesis of viral proteins, at 7 hpi the cells were metabolically labeled with [ $^{35}$ S]Met-Cys, collected at 8 hpi, and analyzed in denaturing polyacrylamide gels. The results are shown in Fig. 3C. Synthesis of influenza virus proteins was undetectable or very scarce if  $\alpha$ -amanitin was present throughout the infection cycle (0 hpi) or added at 0.5 hpi. If the drug was added between 1.5 and 2.5 hpi, a small decrease in viral protein synthesis, compared to untreated cultures, was observed. In contrast, the addition of the drug at later times did not inhibit viral protein synthesis, in agreement with previous results (36). The same samples were used to analyze hypophosphorylated RNAP II levels by Western blot assays. The results are shown in Fig. 3C, bottom panel. The addition of  $\alpha$ -amani-

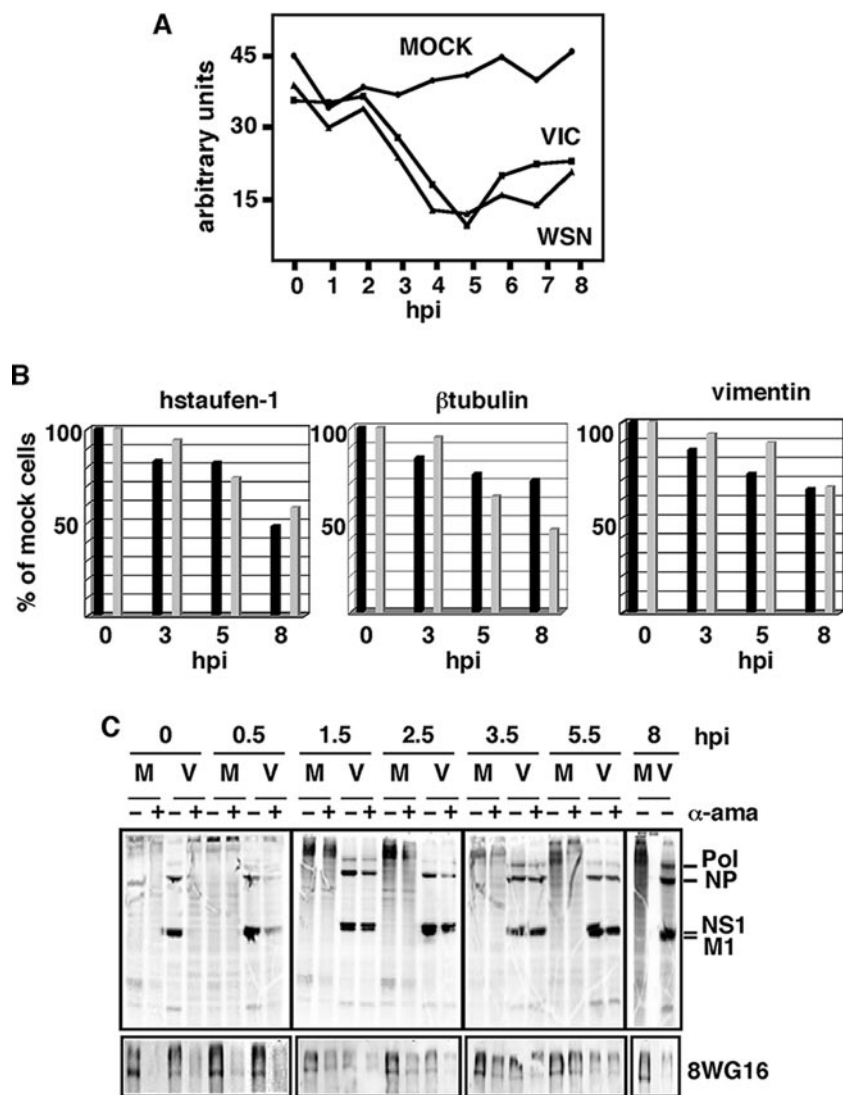


FIG. 3. Dependence of cellular mRNA and viral protein synthesis on active RNAP II. (A) Synthesis of cellular mRNA. HEK293T cells were mock-infected or infected with the VIC or WSN strain of influenza virus, and at the indicated hpi nuclei were isolated and total RNA synthesis was measured by in vitro incorporation of a labeled ribonucleotide with or without  $\alpha$ -amanitin (5  $\mu$ g/ml). The mRNA synthesis due to RNAP II activity is calculated as the difference between the values obtained without the drug (total synthesis is synthesis of RNAP I plus RNAP II plus RNAP III) and with the drug (synthesis of RNAP I plus RNAP III). In the infected cells the contribution of viral replication that is insensitive to  $\alpha$ -amanitin should be taken into account. (B) Synthesis of hStaufen-1,  $\beta$ -tubulin, and vimentin mRNAs. Total labeled RNAs from panel A were used as probes for runoff experiments. Five hundred nanograms of the corresponding coding sequences was used, and the label was quantitated in a phosphorimager. Black bars, cells infected with the VIC strain; gray bars, cells infected with the WSN strain. (C) HEK293T cells were mock infected (M) or infected with the VIC strain of influenza virus (V), and  $\alpha$ -amanitin (50  $\mu$ g/ml;  $\alpha$ -ama) was added (+) or not (–) to the cell culture at the indicated hpi. At 7 hpi the cells were metabolically labeled with [ $^{35}$ S]Met-Cys. Cells were collected at 8 hpi and the synthesized proteins analyzed. At the same times, total cell extracts were used to analyze hypophosphorylated RNAP II by Western blotting (8WG16).

tin between 0 and 0.5 hpi leads to an almost complete degradation of RNAP II, both in uninfected and infected cells, in agreement with previous data reporting that the degradation rate of RNAP II is  $\alpha$ -amanitin dose dependent but is not a consequence of transcriptional arrest (41). From 1.5 to 2.5 hpi the degradation of hypophosphorylated RNAP II increases in the treated and infected cells as a result of the additive effects of both treatments. If the drug is added later, such as at 3.5 hpi, the levels of accumulation of hypophosphorylated RNAP II are similar in treated and uninfected cells and in untreated and infected cells; in this situation viral protein synthesis is normal.

Viral protein and hypophosphorylated RNAP II accumulation at 8 hpi in the absence of  $\alpha$ -amanitin is presented in Fig. 3C, right, for comparison. The results obtained indicate that a fully active, nondegraded hypophosphorylated RNAP II protein is required during the first 0 to 2.5 hpi to allow appropriate viral protein synthesis; after this time the synthesis becomes independent of the integrity of the cellular transcription machinery. Furthermore, the data also indicate that, if a degradation of hypophosphorylated RNAP II similar to that caused by the infection is produced exogenously by  $\alpha$ -amanitin treatment (as described above for 3.5 hpi), it does not impede viral progres-

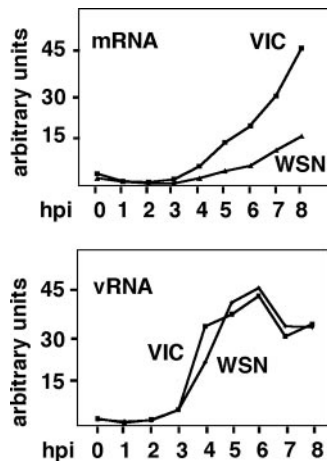


FIG. 4. Degradation of hypophosphorylated RNAP II correlates with the onset of viral transcription and replication. HEK293T cells were mock infected or infected with the VIC or WSN strain of influenza virus, and at the indicated hpi total RNAs were isolated and used to detect the positive sense RNA (top) or the vRNA (vRNA; bottom) of viral nucleoproteins by Northern blot analysis.

sion if this effect takes place at the same time that it would occur naturally during the infection (compare Fig. 1A, 4 hpi).

**The degradation of hypophosphorylated RNAP II correlates with the onset of viral transcription and replication.** To study the relationship between RNAP II degradation and the kinetics of viral transcription and replication, we analyzed the positive and negative sense viral RNA levels during infection. Cultures of HEK293T cells were either mock infected or infected with the VIC or WSN strain, and at the indicated hpi total RNA was isolated and used to detect the positive and negative sense RNA for viral nucleoprotein (Fig. 4, top and bottom panels, respectively). Total positive sense RNA (cRNA plus mRNA) starts accumulating at around 3 hpi and continues increasing until 8 hpi, indicating that its synthesis persists during the infection. As the amount of cRNA is much lower than that of mRNA, the presented data would mainly represent mRNA levels. The NP mRNA levels in the WSN-infected cells were less than those attained in the VIC-infected cells. These results point out that the synthesis of viral messengers takes place even in the context of significantly inactive RNAP II (Fig. 3A), indicating that the availability of 5'-capped cellular premessengers is sufficient to allow viral transcription in these conditions. On the other hand, the accumulation of vRNA starts at around 3 to 4 hpi and attains a maximum at around 6 hpi, with a small decrease at late times postinfection. These data are in agreement with our previous results (29) and different reports (23) using reverse transcription-PCR detection of mRNA, cRNA, and vRNA levels in infected cells. Thus, with different recombinant viruses, an increase of mRNA accumulation until the end of the infection has been shown, whereas cRNA and vRNA accumulation reaches a maximum at around 6 hpi. These results indicate that degradation of hypophosphorylated RNAP II that starts at around 4 hpi (Fig. 1A) correlates with the onset of viral transcription and replication.

**The viral RNA polymerase complex is sufficient to induce the degradation of RNAP II.** The observed degradation of

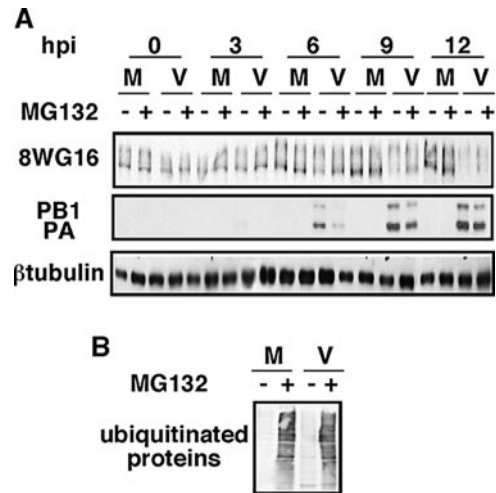


FIG. 5. The proteasome pathway is not involved in the degradation of hypophosphorylated RNAP II. (A) HEK293T cells were mock infected (M) or infected with the VIC strain (V), with (+) or without (-) MG132, and at the indicated hpi hypophosphorylated RNAP II (8WG16) and the designated proteins were detected by Western blotting. (B) Western blot using antiubiquitin antibody of mock-infected cells and cells infected at 10 hpi from panel A.

RNAP II could be the result of either an activity of some viral protein or a cellular proteolytic pathway activated by the infection. Ubiquitin-mediated proteasomal degradation comprises the major proteolytic pathway in eukaryotes. To evaluate its contribution to RNAP II degradation, HEK293T cells were infected or not in the presence or absence of the proteasome inhibitor MG132, which was added 1 h before the infection. At different hpi the levels of accumulation of viral proteins and hypophosphorylated RNAP II were analyzed. The results can be seen in Fig. 5A. The progress of the infection, monitored by observing the appearance of PA and PB1 proteins, was somewhat delayed in the treated cells. In these conditions, almost total degradation of hypophosphorylated RNAP II was observed at 12 hpi, whereas in nontreated cells this effect was observed at 9 hpi. As a control for the effectiveness of the drug, the extracts were probed with antibodies specific for ubiquitin, and an important accumulation of ubiquitinated proteins was observed in the treated cells (Fig. 5B). These results indicate that the proteasome pathway could play some role in influenza virus infection, but it is not responsible for the RNAP II degradation produced by the infection.

Next, we analyzed the contribution of viral proteins to specific RNAP II degradation. We have previously found that the individual expression of the PA subunit causes its own degradation and that of coexpressed proteins and that the 247 N-terminal amino acids are responsible for this activity (50, 52). The use of protease inhibitors, including those of the proteasome pathway, does not inhibit proteolytic activity (data not shown). Similar to RNAP II degradation upon influenza virus infection, no specific cleavage products of the proteins coexpressed with PA can be observed as a result of its proteolytic activity. The mutation of threonine 157 to alanine in the PA molecule (T157A) diminishes the proteolytic activity (43). Taking these data and the reported association of the viral polymerase with RNAP II into account (19), we explored the pos-



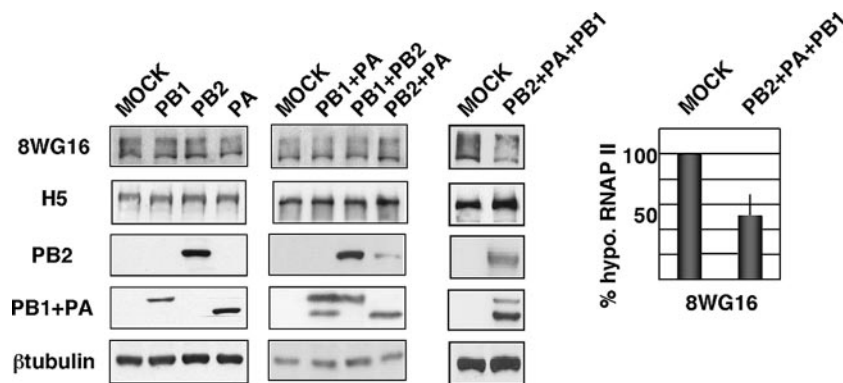


FIG. 6. Reconstituted viral polymerase degrades hypophosphorylated RNAP II. HEK293T cells were transfected with plasmids expressing PA, PB1, or PB2 individually (left), with combinations of two of them (middle), or with plasmids expressing PA, PB1, and PB2 together (right), and at 16 h posttransfection the amounts of hypophosphorylated RNAP II (8WG16), hyperphosphorylated RNAP II (H5), and the indicated proteins were detected by Western blotting. Quantitation of RNAP II degradation under conditions of polymerase reconstitution is shown at the right (means and standard deviations).

sibility that the components of the influenza virus polymerase could produce the degradation of hypophosphorylated RNAP II. HEK293T cells were transfected with plasmids expressing PB1, PB2, or PA or combinations of two plasmids expressing these subunits. After 16 hours of transfection, the amounts of hypophosphorylated and hyperphosphorylated RNAP II were analyzed by Western blotting. The results obtained indicated that neither the individual expression of polymerase subunits nor expression of combinations of two of them induced degradation of hypophosphorylated RNAP II (Fig. 6, left and middle panels). Subsequently, we assayed if the polymerase complex could produce the effect, and hence HEK293T cells were cotransfected with plasmids expressing the three polymerase subunits and processed as above. As can be seen in Fig. 6, *in vivo*-reconstituted influenza virus polymerase was able to degrade hypophosphorylated RNAP II, whereas hyperphosphorylated RNAP II remained unchanged. These transfection experiments were performed three times with similar results, and the quantitation (mean and standard deviation) of RNAP II degradation upon coexpression of the three subunits is shown at the right of Fig. 6. The decrease of hypophosphorylated RNAP II levels due to the expression of the polymerase was smaller than that observed in influenza virus-infected cells. These results are in agreement with the requirement for coexpression of the three subunits in the same cell. In this context, it should be pointed out that, by performing transfection experiments of HEK293T cells with plasmids expressing PA, PB1, and PB2, we have estimated that the percentage of cells coexpressing the three subunits should be between 30 and 60% (data not shown). Consequently the RNAP II coming from cells that do not express the three polymerase subunits will not be degraded and will mask the degradation that takes place in cotransfected cells. Nevertheless, it is also possible that other unidentified viral or virus-induced proteins could be important for this process.

**A recombinant influenza virus encoding a PA mutant defective in proteolysis has a delay in RNAP II degradation.** To analyze if the proteolytic activity of PA could be responsible for the observed degradation, HEK293T cells were infected with recombinant viruses containing a wild-type or a T157A

PA mutant gene. The virus with the mutant gene contains a less proteolytic PA protein and does not show changes in virally induced cellular protein translation shutoff (29). At different hpi, samples were taken and the levels of hypophosphorylated RNAP II were analyzed. The results in Fig. 7 show that the recombinant virus containing a wild-type PA produced degradation of the hypophosphorylated RNAP II with the same kinetics as that observed with the VIC strain. In contrast, infection with the recombinant virus that expresses the PA protein with a decreased proteolytic activity led to a delayed degradation of hypophosphorylated RNAP II, although at later times postinfection similar degradation was attained. This experiment has been performed three times, and, although there were small variations in the time of the initiation of

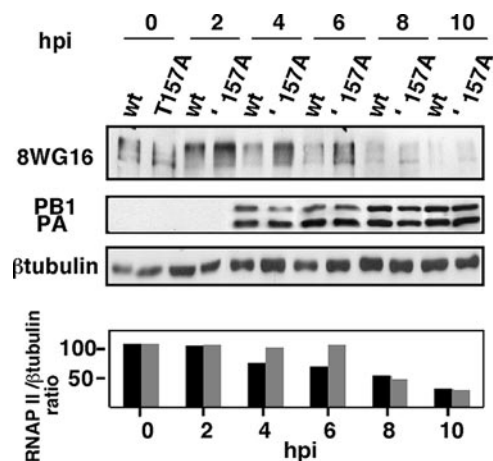


FIG. 7. The PA subunit is involved in hypophosphorylated RNAP II degradation. HEK293T cells were infected with rescued recombinant viruses containing wild-type PA (wt) or T157A mutated PA (T157A), and at different hpi hypophosphorylated RNAP II (8WG16) and the indicated proteins were detected by Western blot assays. (Bottom) Quantitation of hypophosphorylated RNAP II levels during the infection. The ratios of RNAP II/ $\beta$ -tubulin accumulation are shown. Black bars, wt PA; gray bars, PA T157A. Three different experiments were carried out, and a representative experiment is shown.



degradation, it produced the same pattern on all three occasions. To quantitate this effect, the RNAP II and  $\beta$ -tubulin signals obtained in the Western blots were quantitated by densitometry of autoradiographs, and the obtained RNAP II/ $\beta$ -tubulin ratios from a representative experiment are shown in the bottom part of Fig. 7. Previous results have shown that the recombinant virus containing PA T157A has a delayed transport of PA to the nucleus. While the PA subunit is localized in the nucleus at 4 hpi in the wild-type virus, the PA T157A of the recombinant virus goes to the nucleus at 6 hpi (29). The mutant virus also has a weak reduction in virus growth and a decrease in virus RNA replication (29). Thus, the observed delayed RNAP II degradation could be the consequence of any of these phenotypic alterations or a particular combination of some of them. Nevertheless, Fig. 7 shows that, for example, at 6 hpi, although the levels of PA and PB1 protein accumulation in wild-type and mutant virus-infected cells are similar, there are clearly higher remaining levels of RNAP II in cells infected with the PA T157A virus. These results indicate that the PA protein is directly or indirectly involved in the degradation process and suggest that the proteolytic activity of PA within the viral polymerase complex could contribute to the degradation of the hypophosphorylated RNAP II that occurs during the infection.

## DISCUSSION

**Virus-induced modulation of RNAP II.** Some viruses target RNAP II, either increasing or decreasing the degree of phosphorylation of its CTD. HSV-1 is among those whose infection produces loss of serine 2 phosphorylation (14, 21). HSV-1 utilizes the host RNAP II to transcribe its approximately 80 genes in a coordinately regulated cascade. It has been hypothesized that HSV-1 genes, which are short and not configured in standard nucleosomes, may not be subject to transcriptional pausing caused by inherent signals in the gene and/or the action of negative transcription elongation factors. Thus, they may not need Ser-2 phosphorylation of the CTD (21). Bunyamwera virus also prevents CTD phosphorylation at serine 2 (56), suggesting a block in transition from initiation to elongation during infection. Similar to transcription of influenza virus, transcription of bunyaviruses is dependent on host cell mRNAs, since it depends on a cap-snatching mechanism. As the infection should inhibit cellular transcription, it has been postulated that RNAP II activity is dispensable for bunyaviruses and that the pool of cytoplasmic mRNAs would be sufficient to support the viral transcription that takes place in the cytoplasm of the infected cells.

Influenza virus polymerase binds RNAP II both in its hypophosphorylated and serine 5-hyperphosphorylated forms. As the latter is engaged in transcription initiation, this binding could be a manner of placing the viral polymerase close to the sites of generation of the 5'-capped pre-mRNAs. This association might be mediated by the PA-binding protein hCLE, which acts as an RNAP II transcription factor and binds to the hypo- and hyperphosphorylated RNAP II forms (44). Synthesis of mRNAs decreases upon influenza virus infection concomitantly with degradation of hypophosphorylated RNAP II (Fig. 3A and B). The inhibition of RNAP II activity that produces the disappearance of its hypophosphorylated form could

be the consequence of a decreased recycling of the hypophosphorylated and hyperphosphorylated forms or the result of an uncharacterized mechanism. Nevertheless, the inhibition should affect specially the transcriptional elongation activity, because in this situation there is active synthesis of viral mRNAs, which depends on 5'-capped oligonucleotides (Fig. 4), indicating that cellular transcription initiation persists. These results are in agreement with recent reports showing that during influenza virus infection there is a decreased association of RNAP II with the coding regions, whereas no variations are found in the RNAP II associated with the promoter regions (10). Both treatment with  $\alpha$ -amanitin and influenza virus infection cause degradation of hypophosphorylated RNAP II. Nevertheless, in  $\alpha$ -amanitin-treated and infected cells, if the drug is added from 3.5 hpi, the accumulation of viral proteins occurs normally (Fig. 3C). Similarly, viral mRNA levels increase from 3 to 4 hpi despite the degradation of hypophosphorylated RNAP II (Fig. 4). These results suggest that upon infection there are cellular transcription complexes that would be inaccessible to the drug and active for initiation reactions, in spite of the fact that hypophosphorylated RNAP II recycling should be impaired due to its degradation. This effect could represent a strategy to allow the generation of 5'-capped oligonucleotides, avoiding the competition of the RNAP II engaged in mRNA elongation. It should produce cellular transcriptional inhibition and might represent an additional contribution to the general shutoff produced by the infection.

**The PA polymerase subunit could be involved in the degradation of cellular RNAP II.** Different viruses use degradation pathways to impair cellular transcription. Thus, HSV-1 ICP27 protein (14) and poliovirus 3C<sup>pro</sup> protein (3) are involved in RNAP II Ser-2 and TATA binding protein degradation, respectively. In the case of influenza virus infection the viral polymerase induces the degradation of hypophosphorylated RNAP II (Fig. 6). This is the first case of a viral polymerase that targets cellular RNAP II. Within the polymerase complex, the PA subunit could play a role in this process, as suggested by the delayed effect on RNAP II degradation produced by the mutation of threonine 157 of this subunit (Fig. 7). This residue reduces the proteolytic activity of individually expressed PA and is phosphorylated *in vivo* (43). Although a cellular proteolytic pathway induced by the expression of the viral polymerase could be involved in hypophosphorylated RNAP II degradation, several facts directly implicate the viral polymerase. (i) Proteasome inhibitors delay but do not impede RNAP II degradation. This holdup could be the consequence of the delayed viral protein accumulation observed in this situation (Fig. 5A). (ii) Individually expressed PA has proteolytic activity modulated by threonine 157 (52), which is not sensitive to protease inhibitors (data not shown). (iii) PA also has a weak serine protease activity *in vitro*, which resides on the C-terminal part of the molecule (25). Neither the individually expressed polymerase subunits nor the different dimers associate with RNAP II, whereas the trimeric complex possesses this capacity (19). As PA protease activity does not show specificity when individually expressed, it is possible that its association with the polymerase complex could confer the required specificity, rendering hypophosphorylated RNAP II the physiological target for PA proteolytic activity.

Previous reports have shown that PA protease activity appears to be a general characteristic because both human (VIC and PR8) and avian (FPV, MAL, and HK) strains show this phenotype (40). We have previously shown that in vivo-reconstituted RNPs or recombinant influenza viruses containing PA T157A have defects in RNA replication whereas viral transcription remains unaffected (29, 43). The recombinant virus containing PA T157A also has a reduced pathogenicity in mice, indicating that PA proteolytic activity is important for both viral RNA replication and attenuation. Now we provide data suggesting that the PA T157 residue could also be involved in the degradation of RNAP II. Thus, it is possible that degradation of hypophosphorylated RNAP II is important to allow efficient viral RNA replication. Alternatively, the observed RNAP II degradation could be the consequence of viral RNA replication and the impairment shown by PA T157A recombinant virus the result of a defective viral RNA replication process.

Finally, influenza virus and some other viruses whose expression depends on RNAP II inhibit its activity, either by degradation (influenza virus [this report], HSV-1 [14], and La Crosse virus [48]) or by dephosphorylation of its CTD (Bunyamwera virus [56]). These puzzling viral activities could have been selected to avoid the competition of cellular transcription once it is no longer required and would contribute to the overall pathogenesis exerted by the different viruses.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to J. Ortín, U. Garaigorta, and T. Lutz for critical reviews of the manuscript. The technical assistance of Y. Fernández and N. Zamarréño is gratefully acknowledged.

A. Rodríguez was a fellow from Programa Nacional de Formación de Personal Universitario and A. Pérez-González from the Fondo de Investigaciones Sanitarias. This work was supported by Programa Sectorial de Promoción General del Conocimiento (grant BFU2005-02834).

#### REFERENCES

- Aragón, T., S. de la Luna, I. Novoa, L. Carrasco, J. Ortín, and A. Nieto. 2000. Eukaryotic translation initiation factor 4G1 is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus. *Mol. Cell. Biol.* **20**:6259–6268.
- Arrese, M., and A. Portela. 1996. Serine 3 is critical for phosphorylation at the N-terminal end of the nucleoprotein of influenza virus A/Victoria/3/75. *J. Virol.* **70**:3385–3391.
- Banerjee, R., M. K. Weidman, A. Echeverri, P. Kundu, and A. Dasgupta. 2004. Regulation of poliovirus 3C protease by the 2C polypeptide. *J. Virol.* **78**:9243–9256.
- Bárcena, J., D. I. L. S., M. Ochoa, J. A. Melero, A. Nieto, J. Ortín, and A. Portela. 1994. Monoclonal antibodies against the influenza virus PB2 and NP polypeptides interfere with the initiation step of viral mRNA synthesis in vitro. *J. Virol.* **68**:6900–6909.
- Bark-Jones, S. J., H. M. Webb, and M. J. West. 2006. EBV EBNA 2 stimulates CDK9-dependent transcription and RNA polymerase II phosphorylation on serine 5. *Oncogene* **25**:1775–1785.
- Bensaude, O., F. Bonnet, C. Cassé, M.-F. Dubois, V.-T. Nguyen, and B. Palancade. 1999. Regulated phosphorylation of the RNA polymerase II C-terminal domain. *Biochem. Cell Biol.* **77**:1–7.
- Biswas, S. K., and D. P. Nayak. 1994. Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1. *J. Virol.* **68**:1819–1826.
- Blaas, D., E. Patzelt, and E. Keuchler. 1982. Identification of the cap binding protein of influenza virus. *Nucleic Acids Res.* **10**:4803–4812.
- Boulou, M., S. J. Plotch, and R. M. Krug. 1978. Globin mRNAs are primers for the transcription of influenza viral RNA in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**:4886–4890.
- Chan, A. Y., F. T. Vreede, M. Smith, O. G. Engelhardt, and E. Fodor. 2006. Influenza virus inhibits RNA polymerase II elongation. *Virology* **351**:210–217.
- Clemens, M. J., M. Bushell, and S. J. Morley. 1998. Degradation of eukaryotic polypeptide chain initiation factor (eIF) 4G in response to induction of apoptosis in human lymphoma cell lines. *Oncogene* **17**:2921–2931.
- Corden, J. L., J. M. Cadena, J. M. Ahearn, and M. E. Dahmus. 1985. A unique structure at the carboxy terminus of the largest subunit of eukaryotic RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:7934–7938.
- Cujec, T. P., H. Okamoto, K. Fujinaga, J. Meyer, H. Chamberlin, D. O. Morgan, and B. M. Peterlin. 1997. The HIV transactivator TAT binds to the CDK-activating kinase and activates the phosphorylation of the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Genes Dev.* **11**:2645–2657.
- Dai-Ju, J. Q., L. Li, L. A. Johnson, and R. M. Sandri-Goldin. 2006. ICP27 interacts with the C-terminal domain of RNA polymerase II and facilitates its recruitment to herpes simplex virus 1 transcription sites, where it undergoes proteasomal degradation during infection. *J. Virol.* **80**:3567–3581.
- de la Luna, S., J. Martín, A. Portela, and J. Ortín. 1993. Influenza virus naked RNA can be expressed upon transfection into cells co-expressing the three subunits of the polymerase and the nucleoprotein from SV40 recombinant viruses. *J. Gen. Virol.* **74**:535–539.
- Detjen, B. M., C. St. Angelo, M. G. Katze, and R. M. Krug. 1987. The three influenza virus polymerase (P) proteins not associated with viral nucleocapsids in the infected cell are in the form of a complex. *J. Virol.* **61**:16–22.
- Durand, L. O., S. J. Advani, A. P. Poon, and B. Roizman. 2005. The carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II is phosphorylated by a complex containing cdk9 and infected-cell protein 22 of herpes simplex virus 1. *J. Virol.* **79**:6757–6762.
- Elton, D., P. Digard, L. Tiley, and J. Ortín. 2005. Structure and function of the influenza virus RNP. In Y. Kawaoka (ed.), *Contemporary topics in influenza virology*. Horizon Scientific Press, Norfolk, VA.
- Engelhardt, O. G., M. Smith, and E. Fodor. 2005. Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II. *J. Virol.* **79**:5812–5818.
- Falcón, A., R. Marión, T. Zürcher, P. Gomez, A. Portela, A. Nieto, and J. Ortín. 2004. Defective RNA replication and late gene expression in temperature-sensitive influenza viruses expressing deleted forms of the NS1 protein. *J. Virol.* **78**:3880–3888.
- Fraser, K. A., and S. A. Rice. 2005. Herpes simplex virus type 1 infection leads to loss of serine-2 phosphorylation on the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *J. Virol.* **79**:11323–11334.
- Garfinkel, M. S., and M. G. Katze. 1993. Translational control by influenza virus. Selective translation is mediated by sequences within the viral mRNA 5'-untranslated region. *J. Biol. Chem.* **268**:22223–22226.
- Gastaminza, P., B. Perales, A. M. Falcón, and J. Ortín. 2003. Mutations in the N-terminal region of influenza virus PB2 protein affect virus RNA replication but not transcription. *J. Virol.* **77**:5098–5108.
- Gonzalez, S., and J. Ortín. 1999. Distinct regions of influenza virus PB1 polymerase subunit recognize vRNA and cRNA templates. *EMBO J.* **18**:3767–3775.
- Hara, K., M. Shiota, H. Kido, Y. Ohtsu, T. Kashiwagi, J. Iwahashi, N. Hamada, K. Mizoue, N. Tsumura, H. Kato, and T. Toyoda. 2001. Influenza virus RNA polymerase PA subunit is a novel serine protease with Ser624 at the active site. *Genes Cells* **6**:87–97.
- Honda, A., J. Mukaigawa, A. Yokoyama, A. Kato, S. Ueda, K. Nagata, M. Krystal, D. P. Nayak, and A. Ishihama. 1990. Purification and molecular structure of RNA polymerase from influenza virus A/PR8. *J. Biochem. (Tokyo)* **107**:624–628.
- Horisberger, M. A. 1980. The large P proteins of influenza A viruses are composed of one acidic and two basic polypeptides. *Virology* **107**:302–305.
- Huang, T. S., P. Palese, and M. Krystal. 1990. Determination of influenza virus proteins required for genome replication. *J. Virol.* **64**:5669–5673.
- Huarte, M., A. Falcón, Y. Nakaya, J. Ortín, A. García-Sastre, and A. Nieto. 2003. Threonine 157 of influenza virus PA polymerase subunit modulates RNA replication in infectious viruses. *J. Virol.* **77**:6007–6013.
- Huarte, M., J. J. Sanz-Ezquerro, F. Roncal, J. Ortín, and A. Nieto. 2001. PA subunit from influenza virus polymerase complex interacts with a cellular protein with homology to a family of transcriptional activators. *J. Virol.* **75**:8597–8604.
- Isel, C., and J. Karn. 1999. Direct evidence that HIV-1 Tat stimulates RNA polymerase II carboxyl-terminal domain hyperphosphorylation during transcriptional elongation. *J. Mol. Biol.* **290**:929–941.
- Jones, J. C., H. P. Phatnani, T. A. Haystead, J. A. MacDonald, S. M. Alam, and A. L. Greenleaf. 2004. C-terminal repeat domain kinase I phosphorylates Ser2 and Ser5 of RNA polymerase II C-terminal domain repeats. *J. Biol. Chem.* **279**:24957–24964.
- Kimura, N., M. Mishida, K. Nagata, A. Ishihama, K. Oda, and S. Nakada. 1992. Transcription of a recombinant influenza virus RNA in cells that can express the influenza virus RNA polymerase and nucleoprotein genes. *J. Gen. Virol.* **73**:1321–1328.
- Lamb, R. A., and P. W. Choppin. 1977. Synthesis of influenza virus polypeptides in cells resistant to alpha-amanitin: evidence for the involvement of cellular RNA polymerase II in virus replication. *J. Virol.* **23**:816–819.
- Li, M. L., P. Rao, and R. M. Krug. 2001. The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits. *EMBO J.* **20**:2078–2086.

36. Mahy, B. W., N. D. Hastie, and S. J. Armstrong. 1972. Inhibition of influenza virus replication by  $\alpha$ -amanitin: mode of action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**:1421–1424.
37. Mahy, B. W. J. 1983. Mutants of influenza virus, p. 192–253. *In* P. Palese and D. W. Kingsbury (ed.), *Genetics of influenza viruses*. Springer Verlag, Wien, Austria.
38. Mark, G. E., J. M. Taylor, B. Broni, and R. M. Krug. 1979. Nuclear accumulation of influenza viral RNA transcripts and the effects of cycloheximide, actinomycin D and  $\alpha$ -amanitin. *J. Virol.* **29**:744–752.
39. Morley, S. J., P. S. Curtis, and V. M. Pain. 1997. eIF4G: translation's mystery factor begins to yield its secrets. *RNA* **3**:1085–1104.
40. Naffakh, N., P. Massin, and S. van der Werf. 2001. The transcription/replication activity of the polymerase of influenza A viruses is not correlated with the level of proteolysis induced by the PA subunit. *Virology* **285**:244–252.
41. Nguyen, V. T., F. Giannoni, M. F. Dubois, S. J. Seo, M. Vigneron, C. Kedinger, and O. Bensaude. 1996. In vivo degradation of RNA polymerase II largest subunit triggered by alpha-amanitin. *Nucleic Acids Res.* **24**:2924–2929.
42. Palancade, B., and O. Bensaude. 2003. Investigating RNA polymerase II carboxyl-terminal domain (CTD) phosphorylation. *Eur. J. Biochem.* **270**:3859–3870.
43. Perales, B., J. J. Sanz-Ezquerro, P. Gastaminza, J. Ortega, J. Fernandez-Santarén, J. Ortín, and A. Nieto. 2000. The replication activity of influenza virus polymerase is linked to the capacity of the PA subunit to induce proteolysis. *J. Virol.* **74**:1307–1312.
44. Pérez-Gonzalez, A., A. Rodriguez, M. Huarte, I. J. Salanueva, and A. Nieto. 2006. hCLE/CGI-99, a human protein that interacts with the influenza virus polymerase, is a mRNA transcription modulator. *J. Mol. Biol.* **362**:887–900.
45. Plotch, S. J., M. Bouloy, I. Ulanen, and R. M. Krug. 1981. A unique cap(m<sup>7</sup>GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell* **23**:847–858.
46. Poch, O., I. Sauvaget, M. Delarue, and N. Tordo. 1990. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerases encoding elements. *EMBO J.* **8**:3867–3874.
47. Price, D. H. 2000. P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* **20**:2629–2634.
48. Ruf, M., G. Blakqori, V. Wagner, and F. Weber. 2006. The interferon antagonist NSs of orthobunyaviruses targets the phosphorylated form of RNA polymerase II in a proteasome-dependent manner, p. 150. *Abstr. XIII Int. Conf. Negative Strand Viruses*.
49. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
50. Sanz-Ezquerro, J. J., S. de la Luna, J. Ortín, and A. Nieto. 1995. Individual expression of influenza virus PA protein induces degradation of coexpressed proteins. *J. Virol.* **69**:2420–2426.
51. Sanz-Ezquerro, J. J., J. Fernández-Santarén, T. Sierra, T. Aragón, J. Ortega, J. Ortín, G. L. Smith, and A. Nieto. 1998. The PA influenza virus polymerase subunit is a phosphorylated protein. *J. Gen. Virol.* **79**:471–478.
52. Sanz-Ezquerro, J. J., T. Zürcher, S. de la Luna, J. Ortín, and A. Nieto. 1996. The amino-terminal one-third of the influenza virus PA protein is responsible for the induction of proteolysis. *J. Virol.* **70**:1905–1911.
53. Scholtissek, C., and R. Rott. 1970. Synthesis in vivo of influenza plus and minus strand RNA and its preferential inhibition by antibiotics. *Virology* **40**:989–996.
54. Sveistrup, J. Q., P. Vichi, and J.-M. Egly. 1996. The multiple roles of transcription/repair factor TFIIF. *Trends Biochem. Sci.* **21**:346–350.
55. Tamrakar, S., A. J. Kapasi, and D. H. Spector. 2005. Human cytomegalovirus infection induces specific hyperphosphorylation of the carboxyl-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II that is associated with changes in the abundance, activity, and localization of cdk9 and cdk7. *J. Virol.* **79**:15477–15493.
56. Thomas, D., G. Blakqori, V. Wagner, M. Banholzer, N. Kessler, R. M. Elliott, O. Haller, and F. Weber. 2004. Inhibition of RNA polymerase II phosphorylation by a viral interferon antagonist. *J. Biol. Chem.* **279**:31471–31477.
57. Ulanen, I., B. A. Broni, and R. M. Krug. 1981. Role of two of the influenza virus core P proteins in recognizing cap 1 structures (m<sup>7</sup>GpppNm) on RNAs and in initiating viral RNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:7355–7359.
58. Wigler, M., A. Pellicer, S. Silverstein, R. Axel, G. Urlaub, and L. Chasin. 1979. DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:1373–1376.
59. Zhou, M., M. A. Halanski, M. F. Radonovich, F. Kashanchi, J. Peng, D. H. Price, and J. N. Brady. 2000. Tat modifies the activity of CDK9 to phosphorylate serine 5 of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain during human immunodeficiency virus type 1 transcription. *Mol. Cell. Biol.* **20**:5077–5086.